

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

N° 5

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES
GLUCIDES DU PLASMA SANGUIN

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le

PAR

Georges Pierre **PENET**

né le 28 Février 1916 à SAINT-SATURNIN-LES-APT (Vaucluse)

ANCIEN ASSISTANT DE CHIMIE BIOLOGIQUE.
LAURÉAT DE LA FACULTÉ (MÉDAILLE D'OR).

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examineurs
de la Thèse

MM. ROCHE, Professeur, *Président*,
CHEVALLIER, Professeur,
BIERRY, Prof. Faculté des Sciences, } *Assesseurs.*
MALMÉJAC, Prof. sans chaire.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1940

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES
GLUCIDES DU PLASMA SANGUIN

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le

PAR

Georges Pierre PENET

né le 28 Février 1916 à SAINT-SATURNIN-LES-APT (Vaucluse)

ANCIEN ASSISTANT DE CHIMIE BIOLOGIQUE.
LAURÉAT DE LA FACULTÉ (MÉDAILLE D'OR).

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examineurs de la Thèse	{	MM. ROCHE, Professeur, <i>Président</i> ,	{	<i>Assesseurs.</i>
		CHEVALLIER, Professeur,		
		BIERRY, Prof. Faculté des Sciences,		
		MALMÉJAC, Prof. sans chaire.		

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1940

PERSONNEL DE LA FACULTÉ MIXTE

DE

MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : Lucien CORNIL

Assesseur : A. CHEVALLIER

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MOITESSIER, CASSOUTE

Chargés de Cours honoraires : TIAN, BRUN.

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : M^{lle} GEORGE

Professeurs :

Anatomie.....	CORSY
Anatomie pathologique et Pathologie expérimentale.....	CORNIL
Bactériologie	ROUSLACROIX
Chimie analytique et hydrologie	RIMATTEI
Chimie médicale.....	ROCHE
Clinique chirurgicale	FIOLLE
Clinique chirurgicale	BOURDE
Clinique exotique	HECKENROTH
Clinique des maladies nerveuses.....	ROGER
Clinique médicale.....	AUDIBERT
Clinique médicale.....	OLMER
Clinique médicale	MATTEI
Clinique médicale infantile	GIRAUD
Clinique obstétricale	VAYSSIÈRE
Clinique ophtalmologique	AUBARET
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique.....	BREMOND
Clinique urologique.....	CHAUVIN
Histoire naturelle.....	GABRIEL
Histologie.....	ROMIEU
Hygiène générale et coloniale	VIOLLE
Médecine légale	MOSINGER
Parasitologie	JOYEUX
Pathologie interne	MONGES
Pharmacodynamie et matière médicale	F. MERCIER
Pharmacie.....	VIGNOLI
Physiologie	COTTE
Physique.....	CHEVALLIER
Thérapeutique.....	GAUJOUX
Stomatologie (Professeur sans chaire).....	BELTRAMI
Physiologie (Professeur sans chaire).....	MALMÉJAC



Chargé de cours :

Clinique dermatologique VIGNE

Agrégés en exercice :

MM. PIÉRI	MM. SAUTET	MM. ARNOUX
JAYLE	BALANSARD	DELPHAUT
MOIROUD	BRAHIC	IMBERT
CARCASSONNE	FIGARELLA	AUDIER
BERTHIER	SALMON	CHOSSON
POINSO	PAILLAS	DOR
DUBOULOZ		RECORDIER

Agrégé libre :

M. QUINTARET

Chargé des fonctions d'agrégé :

Chimie médicale..... DERRIEN

Chargés de Cours complémentaires :

Anatomie descriptive et topographique	SALMON
Chimie minérale.....	ARNOUX
Médecine du travail.....	PERIOT
Médecine opératoire.....	DOR
Microbiologie.....	QUINTARET
Obstétrique.....	CHOSSON
Pharmacodynamie aux Pharmaciens	DELPHAUT
Psychiatrie.....	ALLIEZ
Toxicologie	GUILLOT
Chimie médicale.....	DUMAZERT



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548219_0091

A MES TRÈS CHERS PARENTS

En témoignage de ma profonde reconnaissance. Leur existence de travail et de dévouement à mon égard restera pour moi un magnifique exemple.

A MA FIANCÉE

A MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN ROCHE

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Il m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son service et de me choisir ensuite comme assistant de Chimie Biologique.

Je me rappellerai toujours ce Maître d'une haute culture, d'une parfaite courtoisie, d'une grande bonté, et dont les directives m'ont été extrêmement précieuses. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon admiration.

A MONSIEUR LE DOCTEUR CHRISTIAN DUMAZERT

CHEF DE TRAVAUX PRATIQUES DE CHIMIE BIOLOGIQUE,

CHARGÉ DE COURS COMPLÉMENTAIRE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Il a été pour moi un véritable ami. Pendant de longues années il a guidé mon travail pas à pas. Les conseils avisés de ce jeune maître ont toujours été pour moi du plus haut intérêt. Son humeur toujours égale aussi bien que sa valeur resteront pour moi de précieux souvenirs. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon attachement.

A LA MÉMOIRE DE MADAME LE DOCTEUR ANDRÉE ROCHE

CHARGÉE D'AGRÉGATION

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

*Je n'ai pas eu l'honneur de travailler
sous sa haute direction ; mais son
renom et sa grande valeur me rap-
pelleront toujours les heures de tra-
vail que j'ai vécues dans le labora-
toire qui porte le nom d'Andrée
ROCHE.*

A MON JURY DE THÈSE

En respectueux hommage.

A TOUS MES PARENTS

A TOUS MES AMIS

A MES CAMARADES
DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
AVANT PROPOS	11
PREMIÈRE PARTIE	
Le sucre libre du plasma sanguin.....	15
INTRODUCTION	15
RECHERCHES PERSONNELLES	21
I. — Choix d'une méthode de dosage de la glycémie....	
Microdosage de la glycémie par la méthode de	
HAGEDORN et JENSEN.....	22
II. — Dosage des glucides fermentescibles en solutions	
très diluées à partir de la détermination de	
l'alcool formé sous l'action de la levure de bière	27
A. Dosage du glucose en solutions pures et	
diluées à partir de l'alcool formé au cours	
de la fermentation par la levure.....	28
B. Etude de la fermentation des solutions très	
diluées de galactose, de glucosamine, de	
mannose et de leurs mélanges.....	33
a. Cas du galactose	34
b. Cas de la glucosamine.....	34
c. Cas du mannose	34
d. — Cas du mélange glucosamine + glu-	
cose + galactose	35
e. — Cas du mélange glucose + galac-	
tose	35
f. — Cas du mélange glucose + mannose	35
C. Application de la technique au dosage du	
sucre libre fermentescible du sang.....	37
III. — Discussion des résultats.....	39
DEUXIÈME PARTIE.	
Les glucides combinés du plasma sanguin.....	41
INTRODUCTION	41
RECHERCHES PERSONNELLES	47
I. — Dosage des glucides combinés du plasma sanguin..	
Microméthode de H. BIERRY permettant le dosage	
du sucre protéidique	47
Microbertrand	49

A. Etude de l'hydrolyse de faibles quantités de plasma en vue du dosage du sucre protéidique	52
1° Etude de l'action de l'acide acétique, 0,2 normal en fonction du temps...	52
2° Etude de l'hydrolyse du plasma par l'acide sulfurique en solutions très diluées	55
3° Etude de l'hydrolyse du plasma par l'acide sulfurique en solution normale	57
B. Technique du microdosage du sucre protéidique proposée	59
C. Justification de la microméthode proposée pour le dosage du sucre protéidique total	59
II. — Nature des glucides combinés du plasma sanguin..	64
A. Sur l'existence d'au moins deux fractions distinctes parmi les glucides combinés du plasma sanguin	65
B. Etude de la fermentescibilité des glucides constituant le sucre protéidique	67
1° Etude de la fermentescibilité des glucides libérables par les acides faibles	67
2° Etude de la fermentescibilité des glucides libérés par l'hydrolyse au moyen de l'acide sulfurique en solution normale	69
Recherche de la glucosamine.....	71
III. — Participation des glucides combinés du plasma sanguin au phénomène de la glycolyse.....	73
Discussion des résultats et Conclusions	77
Résumé des Conclusions.....	87
BIBLIOGRAPHIE	89

AVANT PROPOS.

L'étude des glucides est un des objets les plus importants de la Biochimie.

Les glucides sont des constituants universels des êtres vivants. Les végétaux verts en font la synthèse à partir du gaz carbonique de l'air et de l'eau grâce à l'énergie lumineuse qu'ils captent par leur chlorophylle ; ils élaborent ainsi des molécules simples, les oses, à partir desquelles ils sont capables de former de nombreuses substances de réserve (amidon, inuline), de soutien (cellulose, pectines, xylanes) ou encore des glucosides, des gommes etc... De même les bactéries chez lesquelles on rencontre, en dehors d'oses et d'osides analogues à ceux existant chez les végétaux, diverses associations osidiques douées de pouvoir antigène spécifique.

Les animaux opèrent sans difficulté la synthèse du glucose et, à un degré moindre, celle d'autres oses à partir de chaînes carbonées diverses (glucidiques, lipidiques ou protéïdiques). Mais leurs glucides de réserve et de soutien sont en général différents de ceux des végétaux, le glycogène étant leur principale réserve énergétique facilement mobilisable dans le foie et dans divers tissus.

Il ne nous appartient pas de nous attarder ici sur le mécanisme et l'utilisation des glucides, dans laquelle interviennent les actions conjuguées des centres nerveux et des hormones (insuline, adrénaline et aussi thyroxine) sur les systèmes enzymatiques cellulaires.

Claude BERNARD a établi le premier la présence dans le sang de molécules glucidiques qu'il a essayé de caractériser. Depuis ses travaux, on admet généralement que le « sucre libre » est du glucose ; mais, lorsqu'on veut apporter la preuve formelle de ce fait, on se heurte à des difficultés techni-

ques telles qu'un certain doute subsiste quant à la nature du sucre libre du sang, car il apparaît comme certain que le pouvoir réducteur de certains filtrats de déprotéinisation du plasma sanguin n'est pas dû à la présence d'un seul corps. Aussi avons-nous jugé utile d'entreprendre des recherches pour confirmer ou infirmer le fait que le sucre libre du sang est uniquement constitué par du glucose. Comme nous l'exposerons dans notre introduction, de nombreux procédés analytiques ont été mis en œuvre dans ce but. Toutefois, aucune étude systématique de la fermentation du glucose sanguin n'a été faite du point de vue quantitatif. Aussi avons-nous jugé intéressante une pareille étude et l'un des buts principaux de notre travail a consisté à rechercher si, au cours de la fermentation du sang par la levure de bière, le glucose sanguin donne naissance à une quantité d'alcool caractéristique de ce glucide.

Par ailleurs on sait que le sang ne contient pas des glucides à l'état « libre » sous forme d'oses. On y trouve des osides en combinaison avec des protéines ; ceux-là ne peuvent être mis en évidence qu'après une hydrolyse (sucre protéidique). L'importance de cette fraction glucidique apparaît comme très grande, car LEPINE, BIERRY et divers auteurs ont montré qu'elle participe au métabolisme des glucides. C'est ainsi que dans bien des états pathologiques on constate d'importantes variations du sucre protéidique ; ces variations peuvent être sous la dépendance d'un dérèglement hormonal ou encore la conséquence d'une infection microbienne. Dans ce dernier cas il semble bien que les variations du sucre protéidique soient le reflet des réactions humorales de l'organisme. Ainsi les variations du sucre protéidique pourraient permettre, sinon d'expliquer, mais tout au moins de suivre de près les phénomènes immunologiques.

L'importance du sucre protéidique peut donc à l'avenir se révéler aussi grande que celle du sucre libre. Nous avons entrepris des recherches portant essentiellement sur la mise au point du dosage de ce sucre protéidique et sur la nature de ses constituants ; nous avons enfin essayé de mettre en évidence sa participation à la glycolyse. Pour cela nous avons jugé utile de mettre au point une technique simple de dosage du sucre protéidique et d'ordre micro-analytique.

L'étude de l'hydrolyse aboutissant à la libération du sucre protéidique a retenu particulièrement notre attention ; elle nous a permis de montrer que les acides faibles et les acides forts se comportent à cet égard différemment. L'hydrolyse au moyen des acides faibles (acide acétique) ou des acides forts très dilués (acide sulfurique et chlorhydrique) donne naissance à une première fraction glucidique dont l'étude s'est montrée particulièrement intéressante. La totalité des oses du sucre protéidique est libérée par l'action des acides forts (acide sulfurique) ; on peut donc distinguer deux fractions dans les glucides combinés du sang. La première est celle libérée par action des acides faibles. La seconde peut être dosée par différence entre les glucides totaux résultant de l'hydrolyse par les acides forts et la première. Nous avons ainsi, par des techniques nouvelles, confirmé les résultats de LÉPINE qui admet l'existence dans le sang de deux sortes de glucides combinés : d'une part le « sucre virtuel » faiblement combiné, auquel il attribue un rôle biologique important et, d'autre part, un ensemble de glucides solidement fixés sur les protéines du sang et qui, de ce fait, ne lui paraissent pas avoir la même fonction physiologique. Le sucre libérable par acétolyse a donc particulièrement retenu notre attention en ce qui concerne sa participation aux processus biochimiques et nous nous sommes demandés s'il ne jouerait pas un rôle au cours de la glycolyse.

En résumé nous avons eu pour but dans ce travail :

1° D'apporter une contribution à la connaissance de la nature du sucre libre par l'étude quantitative de la fermentation alcoolique du sang sous l'action de la levure de bière.

2° D'étudier la nature des glucides combinés du plasma sanguin.

3° De rechercher si ces glucides combinés participent ou non au phénomène de la glycolyse.

Ajoutons que de telles recherches nous ont placé le plus souvent dans l'obligation de mettre au point les techniques nécessaires à leur réalisation. Ces recherches purement techniques constituent une partie importante de notre travail.

Il ressort de ce que nous venons d'exposer que nous sommes obligés pour étudier les glucides du sang de considérer d'une part les glucides libres (sucre libre) et d'autre part les

glucides combinés ou associés aux protéines (sucre protéidique). Nous avons donc divisé notre travail en deux parties :

I. — PREMIÈRE PARTIE :

Le sucre libre du plasma sanguin.

II. — DEUXIÈME PARTIE :

Le sucre protéidique du plasma sanguin.

PREMIÈRE PARTIE

Le sucre libre du plasma sanguin.

INTRODUCTION

L'importance même de la question du sucre libre du sang et de son rôle biologique explique le très grand nombre de travaux qui lui ont été consacrés. Ce nombre est tel qu'il ne nous est pas possible dans cette brève introduction d'ébaucher une revue d'ensemble complète des conclusions adoptées par les divers auteurs. Nous nous bornerons à rappeler les principaux, nous attachant particulièrement à ceux ayant servi de point de départ à nos recherches.

Claude BERNARD [5] a prouvé le premier, la présence constante dans le sang des mammifères supérieurs, herbivores ou carnivores, d'une substance glucidique. La valeur de la glycémie, comme l'ont montré en particulier A. BAUDOUIN [3], H. BIERRY [12] varie dans des limites assez restreintes chez divers animaux normaux de même espèce ; par contre elle présente d'assez grands écarts dans les différentes espèces animales.

Plusieurs procédés furent successivement employés par Claude BERNARD pour essayer de déterminer la nature de ce sucre libre. Il a montré d'abord que les filtrats limpides de la déprotéinisation du sang par une solution concentrée de sulfate de sodium, à la température de l'ébullition, réduisent la liqueur de BARRESWILL [1]. Cette réaction lui permet de montrer que ce sucre libre est différent du saccharose. Utili-

(1) Cete liqueur était constituée par du sulfate de cuivre, de la potasse, du carbonate neutre de sodium et de la crème de tartre. La liqueur de FEHLING acutelle ne fut mise au point que plus tard.

sant ensuite la méthode optique imaginée par BIOT, il constate que le sucre du sang présente la même action que le glucose sur la lumière polarisée. Enfin, il pratique sur ces filtrats de déprotéinisation l'étude de la fermentation par la levure de bière. Le dégagement de gaz carbonique prouve également que le sucre du sang présente de grandes analogies avec le glucose. Mais Claude BERNARD ne parvient pas à extraire de ces filtrats de déprotéinisation la substance glucidique elle-même. Il indique seulement les méthodes qui permettent son isolement.

Quarante années plus tard E. FISCHER [31] met au point un procédé nouveau permettant l'identification des glucides. Par action de la phénylhydrazine il obtient des osazones, corps résultant de la combinaison des glucides avec la phénylhydrazine, parfaitement cristallisés et dont les diverses constantes physiques permettent de préciser la nature du glucide entré en combinaison. Mettant à profit cette découverte plusieurs chimistes, et en particulier PICHARDT [64] et MIURA [57], obtiennent à partir de sangs d'animaux une osazone dont les constantes physiques sont très voisines de celles de la glucosazone. Mais la nature du sucre libre restait encore à déterminer, étant donné que le glucose, le fructose, le mannose et la glucosamine donnent naissance à la même osazone.

D'autres biologistes essaient de comparer les résultats obtenus par la méthode de réduction et la méthode polarimétrique. Les résultats auxquels ils parviennent sont contradictoires. Certains comme HÉDON [38], opérant sur des dialysats, trouvent pour les pouvoirs réducteur et rotatoire des valeurs ne correspondant pas au même ose ou oside. LÉPINE [50] arrive à une conclusion identique. Par contre HANRIOT [37], TAKAHASI [73], qui utilisent des filtrats sanguins de déprotéinisation, et plus récemment, en 1924, VIALE [76] sont d'un avis contraire.

Ce n'est qu'en 1930 que L. B. WINTER [77] démontre par des recherches systématiques que le sang contient de l' α -glucopyranose. Par contre les essais destinés à confirmer cette notion au point de vue quantitatif se heurent à des difficultés telles qu'ils n'ont pas fourni les renseignements décisifs que l'on escomptait. En effet, comment expliquer le désaccord qui existe entre le pouvoir rotatoire et le pouvoir réducteur d'un même dialysat sanguin si l'on admet que le sucre libre du

sang est uniquement constitué par de l' α -gluco-pyranose ? J. A. HEWIT et J. PRYDE [45] répondent à cette question en disant que dans l'organisme le glucose se transforme partiellement en une « forme active » (new glucose) qu'ils ne sont pas parvenus à isoler. En effet, ces auteurs, introduisant une solution de glucose dans une anse intestinale vivante, constatent une diminution très nette du pouvoir rotatoire au sein de cette solution. Etant donné l'objectivité de ces expériences, l'existence dans le sang de glucose sous une « forme active » est couramment admise. Ainsi se trouverait expliquée la discordance entre les pouvoirs rotatoire et réducteur des dialysats sanguins. Mais cette explication est purement qualitative et n'implique pas que le glucose soit nécessairement le seul constituant de la glucidémie libre ni la seule substance optiquement active présente dans les dialysats sanguins.

On peut penser que les divergences observées entre les pouvoirs rotatoire et réducteur sont imputables à l'existence dans les dialysats sanguins de substances autres que le glucose, lesquelles, soit par leur propriétés optiques, soit par leurs propriétés réductrices, sont capables d'entraîner d'importantes causes d'erreur dans de telles mesures. D'après J. THOMAS [74] cette hypothèse est à rejeter du fait qu'après fermentation par la levure le pouvoir rotatoire et le pouvoir réducteur qui subsistent sont trop faibles pour expliquer les phénomènes observés avant fermentation des dialysats sanguins. Par contre cet auteur [75] a montré que les dialysats sanguins présentent d'importantes variations de leurs propriétés optiques en fonction du pH, mais que ces dernières « ne peuvent être attribuées à l'action de substances interférentes dont la présence est connue dans le sang, telles que les acides aminés, l'acide lactique, car leur grandeur dépasse de beaucoup celle des variations que présenteraient les substances en question » (loc. cit.) entre les mêmes limites de pH.

Les dosages du pouvoir réducteur du sucre sanguin demandent une grande prudence quant à leur interprétation. On sait en effet que les dialysats ou les filtrats de déprotéinisation préparés en vue du dosage de la glucidémie libre contiennent le plus souvent des substances de nature non glucidique, mais douées de propriétés réductrices vis-à-vis du réactif mis en œuvre pour évaluer le pouvoir réducteur du sucre sanguin. En fait, ce que l'on dose alors c'est la totalité des substances

réductrices et non pas le « sucre vrai », d'où une importante source d'erreur par excès attribuée, à juste titre, à l'imperfection des procédés de déprotéinisation du sang. On conçoit donc toute l'importance que présente le choix d'une méthode chimique de dosage de la glycémie. L'étude comparée des diverses techniques proposées jusqu'à ce jour sortirait du cadre de notre exposé ; aussi renvoyons-nous le lecteur aux publications consacrées à ce sujet par A. BAUDOUIN [4] et par DUMAZERT [20].

On voit donc qu'au point de vue quantitatif l'étude du pouvoir rotatoire et du pouvoir réducteur du sang dialysé ou déprotéinisé ne nous fournit pas de renseignements décisifs sur la nature exacte du sucre libre du sang.

Il nous reste à examiner un dernier moyen d'investigation qui est l'étude de la fermentation alcoolique du sang. Qualitativement, il est facile de constater qu'il existe des glucides fermentescibles dans le sang en ajoutant à ce dernier de la levure de bière. Des déterminations quantitatives des glucides fermentescibles du sang peuvent être réalisées en associant à la fermentation les méthodes de réduction. Il suffit pour cela de doser le pouvoir réducteur du filtrat de déprotéinisation d'un même sang avant fermentation (A) et après fermentation (a). La différence entre ces deux valeurs (A-a) exprime le pouvoir réducteur des glucides fermentescibles qui seuls ont pu disparaître au cours de la fermentation alcoolique du sang. Le pouvoir réducteur (a) qui subsiste après fermentation a reçu le nom de « reste de fermentation » ; il est constitué par l'ensemble de substances réductrices non glucidiques que contiennent presque toujours les filtrats sanguins de déprotéinisation. Ces substances sont très nombreuses et peuvent être azotées (acide urique, créatinine), sulfurées (glutathion, cystine) ou phosphorées (J. ROCHE [67] combinaisons phosphorées acido-solubles, acide adénylique, acides hexose-phosphoriques). Il est indispensable de les éliminer pour ne doser que les glucides dans les filtrats de déprotéinisation. Ainsi apparaît nettement l'importance primordiale de la déprotéinisation. Pour cette opération les sels de mercure, de cadmium et leur association (DUMAZERT [19]) se présentent comme les plus avantageux ; en effet le « reste de fermentation » a alors une valeur très faible. Il faut cependant tenir compte de la spécificité et des susceptibilités réactionnelles particulières à

chaque réactif utilisé dans le dosage qui font que tel mode de déprotéinisation peut convenir à une méthode et s'avérer défectueux pour une autre. Le procédé du reste de fermentation permet d'apporter plus de correction au dosage de la glycémie vraie ou « sucre fermentescible du sang ». En outre il constitue un test intéressant de la valeur des techniques de dosage de la glycémie. Cependant malgré son intérêt ce procédé n'est pas à l'abri de toute critique, surtout si l'on désire en faire état pour fixer la nature du sucre sanguin. En effet, on admet alors que la différence (A-a) représente les glucides fermentescibles du sang sans avoir cependant dosé l'alcool ou le gaz carbonique qui sont les seuls témoins objectifs de la fermentation (BAUDOUIN [4]).

L'étude de la fermentation alcoolique du sang au contact de la levure de bière ne saurait donner des résultats intéressants pour fixer la nature du sucre sanguin que si l'on parvient à montrer que la quantité de gaz carbonique ou d'alcool formée dans ces conditions correspond quantitativement à la glycémie vraie. Or, une pareille étude présente certaines difficultés inhérentes à la fermentation de faibles quantités de glucose contenues dans le sang. Si l'on se propose, comme l'a fait R. F. HOLDEN [45 bis], de déterminer la glycémie à partir du gaz carbonique formé au cours de la fermentation on constate que la quantité de ce gaz qui se dégage est alors nettement inférieure à celle qui correspond au glucose présent. En outre la formation de gaz carbonique n'est pas rigoureusement spécifique de la fermentation alcoolique, car ce gaz peut tirer son origine non seulement des bicarbonates du sang, mais encore de la décarboxylation de certains corps pouvant être présents dans le sang, (acide pyruvique, acétyl-acétique, acides aminés, etc...), sous l'action des enzymes de la levure. La formation d'alcool est plus spécifique mais la quantité d'alcool qui se forme dans les mêmes conditions est également très inférieure à celle prévue par la théorie ; cela s'explique par le fait qu'au cours de la fermentation tout le glucose n'est pas converti en alcool, mais transformé en partie en glycérol ou encore en glycogène, comme l'ont montré R. WILLSTÄTTER et M. RHODEWALD [78]. Il y a lieu de signaler que le dosage du glucose sanguin en mettant en œuvre sa fermentation par un organisme autre que la levure, à savoir le colibacille, a été tenté par RONA et FABISCH [70]. La méthode

de ces auteurs, basée sur la mesure de l'acide carbonique formé dans une enceinte constituée par l'appareil de WARBURG, donnerait des résultats très satisfaisants identiques à ceux de la méthode de HAGEDORN et JENSEN appliquée aux filtrats de déprotéinisation zincique du sérum. Il faut noter toutefois que l'acide carbonique mesuré dans la méthode de RONA et FABISCH n'est pas celui formé au cours de la fermentation mais celui mis en liberté par les produits acides de celle-ci, libérés dans un milieu bicarbonaté. Le principe de cette méthode repose donc sur un emploi indirect de la fermentation. L'intérêt du problème qui consiste à doser le sucre fermentescible du sang à partir de l'alcool formé sous l'action de la levure de bière demeure grand, car sa solution doit permettre, d'une part, d'apporter des données précises sur la nature du sucre sanguin et, d'autre part, d'apprécier objectivement la valeur respective des méthodes de dosage de la glycémie par réduction.

En résumé, on conçoit que, devant de pareilles difficultés techniques, il subsiste quelques incertitudes concernant la nature d'une partie des substances réductrices du sang lorsque l'on considère cette question du point de vue quantitatif. Aussi avons-nous jugé utile d'examiner si la totalité de celles-ci subit quantitativement ou non la fermentation par la levure de bière à l'égal du glucose.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Nous nous sommes proposé de doser le glucose sanguin en déterminant la quantité d'alcool à laquelle il peut donner naissance *dans des conditions bien définies de fermentation* par la levure de bière. Pour cela nous avons mis au point une technique, que l'on trouvera décrite en détails ci-après, dont les résultats doivent permettre de décider si le sucre libre du plasma donne naissance à une quantité d'alcool correspondant quantitativement à celle fournie par du glucose dans les mêmes conditions.

Par ailleurs le choix d'une méthode de référence du dosage de la glycémie s'est imposé pour guider nos recherches. Nous avons opté pour la méthode de HAGEDORN et JENSEN précédée de la déprotéinisation par l'hydrate de cadmium. Cette dernière méthode permet, ainsi que l'ont montré FUJITA et IWATAKE [35], DUMAZERT [19] le dosage de la « glycémie vraie », non entachée d'erreurs dues aux substances réductrices non fermentescibles du sang (reste de fermentation). Ajoutons qu'une telle technique doit trouver sa justification dans la comparaison des résultats qu'elle est capable de fournir avec ceux obtenus par notre méthode biologique consistant à déterminer la glycémie à partir de la quantité d'alcool produite sous l'action de la levure de bière.

Telle est la nature des recherches que nous avons entreprises et dont le but essentiel est d'apporter une contribution susceptible de confirmer ou d'infirmer la notion que le sucre libre du sang est constitué uniquement par du glucose, notion que l'on tend à admettre de plus en plus sans qu'aucune preuve formelle de son exactitude ait été donnée.

I. Choix d'une méthode de dosage de la glycémie.

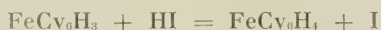
On conçoit que pour un travail comme le nôtre il ait paru indispensable de faire appel à une microméthode chimique de dosage de la glycémie aussi précise et fidèle que possible. Etant données les nombreuses solutions qu'a reçu le problème du microdosage de la glycémie, un choix s'est avéré nécessaire. Nous ne saurions introduire ici une étude comparée des diverses méthodes proposées jusqu'à ce jour. Nous renvoyons le lecteur aux publications faites par A. BAUDOUIN, BIERRY et RATHERY, FONTÈS et THIVOLLE sur ce sujet. Nous remercions en outre MM. J. ROCHE [28] et C. DUMAZERT dont les directives nous ont évité bien des tâtonnements à cet égard. DUMAZERT a montré par une étude systématique que la méthode de HAGEDORN et JENSEN peut être considérée comme la méthode de référence que nous cherchions car elle offre l'avantage de permettre les dosages sur 0,1 cm³ de sang déprotéinisé à l'hydrate de cadmium et ses résultats sont l'expression de la « glycémie vraie » ou sucre fermentescible du sang. En effet, ainsi que nous l'avons dit, l'étude du reste de fermentation constitue un test très intéressant de la valeur des techniques de dosage de la glycémie. Il a permis à C. DUMAZERT [19] de montrer que la méthode de HAGEDORN-JENSEN, précédée de la déprotéinisation par l'hydrate de cadmium, permet de déterminer directement la glycémie vraie (sucre fermentescible du sang) puisque le reste de fermentation est alors pratiquement nul. Reprenant l'étude de A. FUJITA et D. IWATAKE [35] qui avaient déjà signalé qu'en utilisant l'hydrate de cadmium comme agent de déprotéinisation les filtrats sanguins obtenus sont dépourvus de reste de fermentation. C. DUMAZERT a modifié la technique de déprotéinisation de ces auteurs pour l'appliquer à la méthode de HAGEDORN et JENSEN. Il confirme que la défécation par l'hydrate de cadmium conduit à des « restes de fermentation » dont les valeurs varient de 0 à 0,02 (en g. de glucose p. 1.000 cm³ de sang), alors qu'avec la défécation par l'hydrate de zinc ces valeurs varient de 0,05 à 0,27. Nous basant sur ces résultats nous avons pris la méthode de dosage de la glycémie de HAGEDORN et JENSEN, avec défécation cadmique, comme méthode de référence. Nous croyons utile de la décrire en insistant sur

les détails techniques les plus importants, car cette méthode a été le principal instrument de nos recherches.

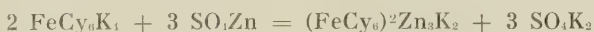
**Microdosage de la glycémie par la méthode
de Hagedorn-Jensen.**

PRINCIPE DE LA MÉTHODE. — Lorsqu'on chauffe à l'ébullition une solution alcaline de glucose en présence de ferricyanure de potassium celui-ci est réduit. Dans certaines conditions, la quantité de ferricyanure réduit permet d'évaluer la quantité de glucose mise en jeu.

Ce principe est appliqué de la façon suivante : après déprotéinisation du sang on additionne le filtrat obtenu d'un volume connu d'une solution titrée de ferricyanure de potassium alcalinisée par du carbonate de sodium et on porte pendant 15 minutes au bain-marie bouillant. Une fois l'oxydation du glucose par le ferricyanure réalisée, le milieu contient du ferrocyanure de potassium et un excès de ferricyanure : c'est celui-ci que l'on dose par iodométrie. En effet après addition d'iodure de potassium et acidification du milieu, la réaction :



libère de l'iode en quantité correspondante à celle du ferricyanure présent. Comme l'iode libéré pourrait réoxyder le ferrocyanure on précipite ce dernier à l'état de combinaison zincique suivant :



Il suffit pour cela d'ajouter avant la libération de l'iode un excès de sulfate de zinc.

TECHNIQUE. — Voici maintenant le mode opératoire. Il comprend trois temps :

1° *Déprotéinisation.* — Introduire dans un tube à essais à bec de 6 cm. de long 2 cm³ de la solution suivante :

Sulfate de cadmium crist. pur.....	13 g.
Solution normale d'acide sulfurique..	60,5 cm ³
Eau distillée q. s. p.....	1.000 cm ³

puis 0,1 cm³ de sang ou de plasma mesuré avec les précautions d'usage. Agiter avec une petite baguette de verre et laisser en contact cinq minutes. Ajouter alors peu à peu, et en agitant, 1 cm³ de solution de soude 0,275 N ; agiter et filtrer sur un papier filtre sans cendres ; laver le précipité à

trois reprises avec chaque fois 2 cm³ d'eau distillée ; recueillir le filtrat et les eaux de lavage dans un gros tube à centrifuger. Le filtrat est prêt pour le dosage ; il doit être parfaitement limpide, incolore et neutre au papier de tournesol.

2° *Oxydation du glucose.* — Ajouter au filtrat 2 cm³ très exactement mesurés du réactif suivant :

Ferricyanure de potassium pur....	1,65 g.
Carbonate de sodium pur anhydre.	10,60 g.
Eau distillée q. s. p.....	1.000 cm ³

On rince les parois du tube avec un jet de micro-pissette ; on agite et on bouche avec un tampon d'ouate ou un capuchon de papier filtre.

Simultanément on prépare un essai témoin. Pour cela 2 cm³ du réactif au sulfate de cadmium sont traités par 1 cm³ de soude 0,275 N ; agiter, filtrer et laver le précipité. Le filtrat et les eaux de lavage résultant de cette opération sont également recueillis dans un gros tube à centrifuger et additionnés de 2 cm³ de solution de ferricyanure.

Essais et témoin sont placés dans un bain-marie bouillant où on les laissera pendant 15 minutes exactement. Au bout de ce temps, on retire les tubes du bain-marie, on les refroidit sous un courant d'eau froide.

3° *Titration iodométrique de l'excès de ferricyanure.* — On ajoute dans chacun des tubes 3 cm³ de la solution suivante :

Iodure de potassium	5 g.
Sulfate de zinc crist.....	10 g.
Chlorure de sodium	50 g.
Eau distillée q. s. p.....	200 g.

puis 2 cm³ d'une solution d'acide acétique à 3 p. 100. On laisse réagir 2 à 5 minutes. Au bout de ce temps, la libération d'iode est complète et correspond quantitativement au ferricyanure restant. L'iode est titré au moyen d'une solution N/200 de thiosulfate de sodium (préparée au moment du besoin en raison de sa mauvaise conservation) en utilisant la micro-burette graduée au centième de cm³ et en présence de trois ou quatre gouttes d'une solution d'amidon soluble ou de réactif de TRÖMSDORF.

CALCUL DES RÉSULTATS. — Les auteurs ont dressé une table permettant de passer directement du nombre de cm³ lus sur la burette à la quantité de glucose. Le calcul doit cependant

tenir compte de l'essai témoin. Prenons un exemple numérique : soit 1,41 cm³ le volume d'hyposulfite N/200 versé au cours du titrage de l'essai proprement dit ; dans la table à double entrée (que nous avons reproduites ci-dessous v. p. 26) nous voyons que ce volume correspond à 0,104 mg. de glucose. Soit 1,92 cm³ le volume d'hyposulfite versé au cours du titrage de l'essai témoin ; dans la même table nous lisons une correspondance en glucose de 0,014 mg. La teneur en glucose de la prise d'essai, c'est-à-dire 0,1 cm³ de sang, sera :

$$0,104 - 0,014 = 0,090 \text{ mg.}$$

Exprimée en grammes de glucose par litre, cela nous fournit une glycémie de 0,90 g. p. 1.000 cm³.

Cette méthode permet le dosage de 0,02 mg. à 0,30 mg. de glucose, avec une erreur de 1 à 2 p. 100. Elle permet également le dosage d'autres glucides réducteurs ; mais alors, comme pour la méthode de BERTRAND, il est nécessaire de se reporter pour chacun d'eux à une table particulière, car leur pouvoir réducteur respectif diffère.

Il convient toutefois de noter que la solution à base de sulfate de zinc, de chlorure de sodium et d'iodure de potassium ne se conserve pas ; il vaut mieux n'ajouter qu'au moment du besoin l'iodure de potassium que l'on dissoudra dans une petite quantité de la solution suivante :

Sulfate de zinc crist. pur.....	50 g.
Chlorure de sodium pur.....	250 g.
Eau distillée q. s. p.....	1.000 cm ³

Cette dernière se conserve indéfiniment.

Telle est la méthode de dosage du sucre libre que nous avons adoptée pour l'ensemble de nos recherches en raison de l'avantage qu'elle présente de permettre une prise d'essai de 0,1 cm³ de plasma tout en donnant des résultats comparables entre eux à 1 ou 2 p. 100, ce qui constitue une précision remarquable. Rappelons que cette technique est une des rares, parmi les méthodes de dosage de la glycémie, à donner des résultats non entachés des erreurs dues aux restes de fermentation.

Tableau de correspondance en glucose (mg. p. 0,1 cm³) du nombre
de cm³ de thiosulfate de sodium N/200 employés au dosage.

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	0,385	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,335
0,2	0,331	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,002

Nous allons maintenant exposer nos recherches d'ordre quantitatif sur la fermentation du sang au contact de la levure de bière et ayant pour but de nous rendre compte si le sucre libre donne naissance à une quantité d'alcool correspondant exactement ou non au glucose sanguin. Comme nous allons le voir, les caractères spéciaux, que revêt la fermentation du glucose en solutions très diluées, nous ont obligés à mettre au point la technique nécessaire à cette étude. Nous verrons tout d'abord comment nous sommes parvenus à réaliser le dosage du glucose en solutions très diluées à partir de l'alcool formé au cours de la fermentation par la levure de bière.

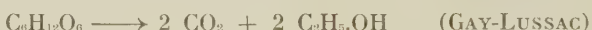
II. - Dosage des glucides fermentescibles en solutions très diluées à partir de la détermination de l'alcool formé sous l'action de la levure de bière.

Avant nous R. F. HOLDEN [45 bis] a décrit une technique de dosage du glucose fondée sur la détermination volumétrique du gaz carbonique résultant de la fermentation du sang. Or le dosage de l'alcool est plus intéressant car la formation de cette substance est plus spécifique de la fermentation alcoolique que ne l'est celle du gaz carbonique. L'étude de la fermentation de petites quantités de glucose par le dosage de l'alcool produit a été déjà entrepris par M. NICLOUX et P. GRABAR [60] qui, opérant sur une solution de glucose dont la concentration est voisine de 2 g. p. 1.000 cm³ d'eau, obtiennent un rendement en alcool variant de 70,5 à 77 p. 100. De même R. GUILLEMET [36] a étudié le rendement en alcool de la fermentation de solutions diluées de divers glucides. Mais nous n'avons pas trouvé de renseignements précis au sujet d'une technique permettant de doser les glucides fermentescibles du sang à partir de l'alcool qui se forme dans les mêmes conditions. Aussi avons-nous tout d'abord mis au point une méthode de dosage du glucose, et d'autres glucides, en solutions pures de concentrations voisines du taux normal de la glycémie, à partir de l'alcool se formant sous l'action de la levure de bière. Nous allons décrire cette technique, ce qui nous donnera l'occasion de formuler quelques remarques intéressantes sur l'évolution et le rendement en alcool de la fermentation de divers glucides en solutions très diluées

(0,10 g. p. 100) par la levure. Nous verrons ensuite comment nous avons pu appliquer cette technique au dosage des glucides fermentescibles du sang.

A. — Dosage du glucose en solution aqueuse diluée à partir de l'alcool formé au cours de la fermentation par la levure.

Théoriquement le dosage de l'alcool produit par la fermentation du glucose permettrait de calculer la quantité de glucose qui lui a donné naissance d'après l'équation chimique suivante :



En réalité cela n'est pas aussi simple et L. PASTEUR remarqua le premier que le rendement en alcool de la fermentation du glucose est inférieur à celui prévu par la réaction ci-dessus. Pour des solutions renfermant quelques grammes pour cent de glucose ce rendement atteint un maximum de 94 p. 100, puis l'alcool disparaît lentement du milieu où la levure le consomme. La fermentation de solutions plus diluées, contenant du glucose à des concentrations voisines de 0,1 g. p. 100, évolue de façon très différente ainsi que le montrent les valeurs de son rendement en fonction du gaz carbonique produit, lequel est de l'ordre de 77 p. 100 (R. H. HOPKINS et R. H. ROBERTS [47]. NICLOUX et GRABAR [60], GUILLEMET [36] effectuent leurs mesures non pas à partir du gaz carbonique mais à partir de l'alcool formé et obtiennent des rendements du même ordre pour des solutions de glucose de concentration voisine de 0,2 g. p. 100. D'une façon générale on constate que la dilution du glucose abaisse le rendement en gaz carbonique et en alcool.

On peut prévoir en effet que le rendement en alcool de la fermentation de telles solutions glucosées doit être sous la dépendance de deux facteurs principaux, à savoir : la concentration du glucose et enfin la durée de la fermentation, si l'on fixe par ailleurs la température, la quantité et la qualité de levure mis en œuvre et le pH du substrat. Nous avons donc entrepris l'étude systématique de l'influence de ces deux facteurs sur l'évolution de la fermentation de solutions diluées de glucose afin de fixer les conditions précises permettant de doser ce glucide à partir de la quantité d'alcool à laquelle il donne alors naissance.

MODE OPÉRATOIRE ET TECHNIQUE UTILISÉE. — Nos recherches portent sur des solutions tampon phosphatées (1) contenant entre 0,60 g. et 1,80 g. pour 1.000 cm³ de glucose et dont le pH se trouve ainsi ajusté à la valeur de 5,6 qui est celle de l'optimum d'action de la levure. 25 cm³ de solution glucosée sont additionnés de 0,2 cm³ d'une suspension de 5 g. de levure fraîche de boulangerie (2) dans 5 cm³ d'eau salée physiologique (3) et placés à l'étuve à 37° C. Après fermentation on ajoute 40 cm³ d'eau distillée et au moyen d'un appareil de SCHLÆSING et AUBIN on distille exactement 25 cm³ de liquide. Le dosage de l'alcool est alors exécuté par la méthode de M. NICLOUX [59] sur 5 cm³ de distillat.

a) *Evolution de la fermentation en fonction du temps.* — Conformément aux indications ci-dessus, plusieurs séries d'essais correspondant chacune à une concentration donnée en glucose ont été mises simultanément en expérience. Pour chacune d'entre elles nous avons dosé la quantité d'alcool formé après avoir laissé évoluer la fermentation pendant des temps compris entre une et sept heures. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau I et certains d'entre eux ont été traduits graphiquement dans la figure A [21].

(1) Cette solution contient : phosphate monopotassique (PO_4KH_2) 3 g. ; phosphate disodique ($\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 2 g. ; eau distillée q. s. p. 1.000 cm³.

(2) La levure utilisée avait pour marque : levure « Viva » des établissements Lesaffre et Cie, Marcq-en-Barœul (Nord).

(3) Nous avons opté pour la mise en œuvre d'une faible quantité de levure, en nous basant sur les travaux de E. EGE et J. ROCHE sur la détermination du reste de fermentation du sang.

TABLEAU I.

Evolution de la fermentation en fonction du temps.

Concentrations des solutions de glucose mises en œuvre (en g. p. 1.000 cm ³)	Durée de la fermentation	Alcool dosé (en mg. p. 1.000 cm ³)
1,80	1 heure	557
	1 heure 15 min.	558
	1 heure 45 min.	564
	2 heures	566
	2 heures 30 min.	574
	3 heures	572
	4 heures	558
	5 heures	502
1,20	6 heures	410
	7 heures	310
	1 heure 30 min.	282
1,00	2 heures 30 min.	295
	4 heures	276
0,80	1 heure 30 min.	230
	2 heures 30 min.	240
	4 heures	216
0,75	1 heure 30 min.	164
	2 heures 30 min.	175
	4 heures	158

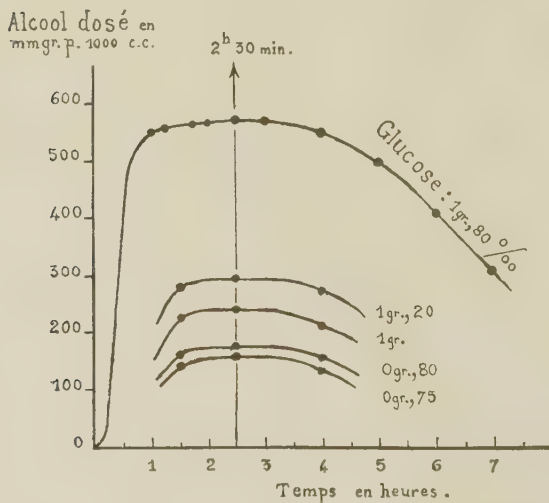


FIGURE A. — Evolution de la fermentation de solutions diluées de glucose en fonction du temps (pour des concentrations données) et des quantités d'alcool prenant alors naissance.

Il ressort de l'examen de ces résultats que *pour une concentration donnée en glucose la quantité d'alcool produit croît rapidement en fonction du temps ; elle atteint un maximum au bout de deux heures quinze minutes environ et se maintient sensiblement constante jusqu'à deux heures quarante cinq minutes pour décroître ensuite brusquement.* Dans l'intervalle des concentrations en glucose considéré (0,60 g. à 1,80 g.) la quantité maxima d'alcool dosée est *toujours* obtenue au bout de deux heures trente minutes de fermentation ; elle présente alors une valeur constante caractéristique du taux de la solution de glucose mis en jeu. A cette quantité maxima d'alcool dosé correspond le rendement maximum de la fermentation.

b) *Valeur du rendement maximum en alcool en fonction de la concentration du glucose.* — Dans le but d'étudier comment varie ce rendement maximum nous avons effectué le dosage de l'alcool formé au bout de deux heures trente minutes de fermentation dans des solutions dont la concentration en glucose variait de 0,60 g. à 1,80 g. p. 1.000 cm³. Nous avons constaté ainsi que ce rendement maximum est d'autant plus bas que la solution de glucose est plus diluée. Les résultats de ces déterminations, consignés dans le tableau II, montrent que le rendement maximum passe de 39,7 p. 100 à 62,3 p. 100 lorsque la teneur de glucose varie de 0,60 g. à 1,80 g. p. 1.000 cm³ et qu'il présente bien *une valeur caractéristique pour une concentration donnée en glucose* [23].

TABLEAU II.

Valeur du rendement maximum en alcool en fonction de la concentration en glucose. (Durée de la fermentation 2 heures 30 minutes).

Glucose mis en œuvre (en g. p. 1.000 cm ³)	Alcool dosé (en g. p. 1.000 cm ³)	Rendement en alcool p. 100
0,60	0,122	39,7
0,65	0,134	40,3
0,70	0,146	41,3
0,75	0,160	43,6
0,85	0,188	43,3
0,90	0,204	44,3
0,95	0,220	45,3
1,00	0,237	46,3
1,10	0,264	47,0
1,20	0,295	48,1
1,25	0,320	50,1
1,80	0,574	62,3

Ceci étant nous avons tracé la courbe des quantités maxima d'alcool formées (en 2 heures 30 minutes) en fonction des concentrations en glucose. Cette courbe, représentée sur la figure B, se rapproche très sensiblement d'une droite pour des concentrations en glucose comprises entre 0,60 g. et 1,25 g. p. 1.000 cm³.

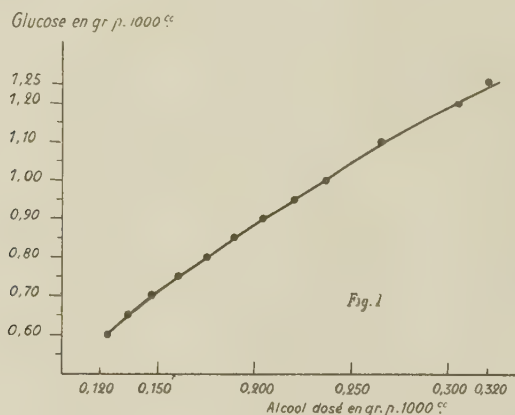


FIGURE B. — Courbe des quantités maxima d'alcool formées au bout de 2 heures 30 minutes de fermentation en fonction des concentrations des solutions de glucose.

En se rapportant à ce graphique on voit qu'il est donc possible de déterminer la teneur d'une solution de glucose à partir de l'alcool produit, au bout de deux heures trente minutes de fermentation effectuée dans les conditions que nous avons adoptées. La précision des dosages est alors voisine de 2 p. 100 ; les erreurs sont le plus souvent par défaut, mais ne s'élèvent jamais au-dessus de 5 p. 100.

Il faut cependant remarquer que cette technique ne saurait prétendre avoir un caractère général, étant données les différences que présente l'évolution de la fermentation selon la qualité de la levure utilisée. Il est donc nécessaire de faire un étalonnage spécial à partir de solutions de glucose de titre connu pour chaque levure.

Par ailleurs, puisqu'il n'est pas absolument prouvé que le glucose soit le seul glucide présent à l'état libre dans le sang, il nous a paru intéressant d'étudier également la fermentation d'autres glucides dans les conditions que nous venons de décrire.

Avant nous ARMSTRONG [2] a montré que certaines levures permettent la fermentation du galactose. HOPKINS [46], SOBOTKA et REINER [71], étudiant la fermentation d'une solution à parties égales de glucose et de fructose, ont montré qu'en utilisant certaines levures le glucose fermente plus rapidement, alors qu'avec d'autres levures il est possible d'obtenir sélectivement une fermentation du fructose plus rapide que celle du glucose. RAYMOND et BLANCO [65] ont constaté que certains glucides en solution étaient absorbés par les levures. Le fructose et le mannose sont partiellement absorbés ; le glucose l'est quantitativement ; par contre le xylose, le ribose, l'arabinose, le lactose et le maltose ne sont pas absorbés. Ces auteurs ont également mis en évidence l'action sélective de la levure qui absorbe le glucose quand il est mélangé à d'autres glucides non absorbables. D'autre part, certains glucides réputés infermentescibles peuvent, en présence de glucose, être entraînés à fermenter eux-mêmes.

En conséquence, notre étude a porté sur les glucides suivants : le mannose, le galactose, la glucosamine, soit en solution pure, soit en solution constituée par leur mélange, et cela en présence ou en absence du glucose. En outre les résultats de telles recherches présentent un intérêt tout particulier car l'ensemble des glucides ci-dessus apparaît au cours de l'hydrolyse que l'on effectue pour mettre en évidence et doser les sucres combinés du sang.

Nous avons pensé que ces recherches nous permettraient de discuter utilement la nature de ces derniers, tout au moins en ce qui concerne la caractérisation des glucides fermentescibles participant à la constitution du sucre protéidique.

B. - *Etude de la fermentation des solutions très diluées de galactose, de glucosamine, de mannose, et de leurs mélanges.*

Nous avons soumis à la fermentation successivement des solutions de galactose, de glucosamine et de mannose, dans des conditions expérimentales identiques à celles exposées ci-dessus pour le glucose (voir p. 28). Nous avons ensuite envisagé la fermentation de leurs mélanges : glucosamine + glucose + galactose ; glucose + galactose et glucose + mannose.

a) CAS DU GALACTOSE. — Une solution à 1 g. p. 1.000 cm³ soumise à la fermentation alcoolique, dans les conditions où nous nous sommes placés, ne donne naissance qu'à des quantités insignifiantes d'alcool, variant de 8 mg. à 14 mg. pour 1.000 cm³ ; dans les mêmes conditions expérimentales une solution à 1 g. p. 1.000 cm³ de glucose fournit 240 mg. d'alcool p. 1.000 cm³. Ces résultats nous permettent d'affirmer que le galactose ne fermente pratiquement pas dans de telles conditions.

b) CAS DE LA GLUCOSAMINE. — Une solution de glucosamine à 1 g. p. 1.000 cm³ produit, dans les mêmes conditions, des quantités d'alcool aussi faibles variant de 6 à 8 mg. p. 1.000 cm³. Ici encore nous constatons que les quantités d'alcool formées sont négligeables. Nous pouvons donc considérer la glucosamine et le galactose comme infermentescibles dans de telles conditions.

c) CAS DU MANNOSE. — Une étude systématique de la fermentation du mannose, analogue à celle de la fermentation du glucose, que nous avons faite en fonction du temps et de la concentration nous a donné les résultats suivants :

1. *Evolution en fonction du temps.* — Une solution à 1 g. p. 1.000 cm³ soumise à la fermentation nous a donné les valeurs consignées au tableau III, nous permettant d'affirmer que le rendement maximum en alcool de cette réaction est obtenu au bout de 2 heures 30 minutes, comme pour le glucose.

TABLEAU III.

Evolution de la fermentation du mannose en solution diluée (1 g. p. 1.000 cm³) en fonction du temps.

Durée de la fermentation (en heures)	Alcool dosé (en g. p. 1.000 cm ³)
1 heure 30 min.	0,204
2 heures	0,210
2 heures 30 min.	0,225
3 heures	0,220
3 heures 30 min.	0,194
4 heures	0,174
5 heures	0,166

2. *Evolution en fonction de la concentration.* — Comme dans le cas du glucose nous avons soumis à la fermentation

des solutions de concentration croissante et nous avons mesuré les quantités d'alcool qui prennent alors naissance. Pour une durée de la fermentation de 2 heures 30 minutes une solution de mannose à la concentration de 0,50 g. p. 1.000 cm³ nous fournit 0,102 g. d'alcool ; une solution à 0,60 g. donne 0,120 g. d'alcool ; une solution à 0,75 g. en produit 0,156 g. alors qu'une solution à 1 g. p. 1.000 en donne 0,225 g. et une solution à 1,25 g. fournit 0,295 g. d'alcool.

L'étude de la fermentation du mannose en fonction du temps et de la concentration nous montre que le rendement maximum en alcool de cette réaction est toujours obtenu au bout de 2 heures 30 minutes, mais que les quantités d'alcool obtenues au bout de ce temps sont légèrement inférieures, de 2 à 8 p. 100 pour des concentrations comprises entre 0,50 g. et 1,25 g. p. 1.000 cm³, à celles obtenues dans les mêmes conditions avec le glucose [24].

d) CAS DU MÉLANGE : GLUCOSAMINE + GLUCOSE + GALACTOSE. — Pour des solutions contenant 1 g. p. 1.000 de chacun de ces oses, nous avons constaté la production d'une quantité d'alcool de 245 mg. p. 1.000, qui correspond pratiquement à celle résultant de la fermentation du glucose à la même concentration. Ce résultat nous montre que le glucose fermente alors pratiquement comme s'il était seul, sans que la présence des autres glucides favorise ou entrave sa propre fermentation.

e) CAS DU MÉLANGE : GLUCOSE + GALACTOSE. — Une étude semblable entreprise sur la fermentation d'une solution contenant 1 g. p. 1.000 de glucose et 1 g. p. 1.000 de galactose, au cours de laquelle 238 mg. d'alcool prennent naissance nous permet de formuler une conclusion identique à la précédente, à savoir qu'ici encore le glucose fermente comme s'il était seul.

f) CAS DU MÉLANGE : GLUCOSE + MANNOSE. — Ce dernier cas nous a paru le plus intéressant, et son étude a été entreprise avec plus de détails. Une solution à 1 g. de glucose et à 0,80 g. de mannose p. 1.000, soumise à la fermentation dans les mêmes conditions et pendant des temps croissants, nous a fourni les quantités d'alcool suivantes consignées au tableau IV :

TABLEAU IV.

Quantités d'alcool produites au cours de la fermentation du mélange glucose + mannose, en fonction du temps.

Durée de la fermentation (en heures)	Quantités d'alcool produites (en grammes)
1 heure 30 min.	0,432
1 heure 45 min.	0,448
2 heures	0,468
2 heures 15 min.	0,490
2 heures 30 min.	0,500
2 heures 45 min.	0,497
3 heures	0,508
3 heures 15 min.	0,540
3 heures 30 min.	0,566
3 heures 45 min.	0,562
4 heures	0,560
4 heures 30 min.	0,530

Après 2 heures 30 min. environ de fermentation, la quantité d'alcool formée reste constante pendant 30 minutes ; elle présente alors une valeur de 0,5 g. p. 1.000 cm³ (ce qui correspond à 1,60 g. de glucide exprimé en glucose). Puis la formation d'alcool reprend et, après 3 heures 45 min. nous obtenons la quantité maxima d'alcool égale à 0,556 g. p. 1.000, un peu inférieure à celle que donnerait 1,80 g. de glucose, au bout de 2 heures 30 min. de fermentation (soit 0,574 g.). Par la suite l'alcool disparaît peu à peu. Ces résultats sont traduits graphiquement par la courbe de la figure C.

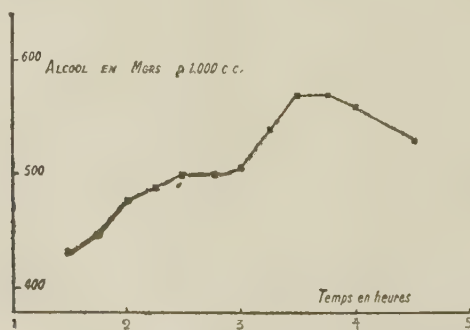


FIGURE C. — Quantités d'alcool formées aux dépens d'un mélange de 0,80 g. de mannose et de 1 g. de glucose p. 1.000 cm³ sous l'action de la levure de bière et en fonction du temps.

L'étude de ces différents cas, envisagés successivement, nous a permis de vérifier que dans les conditions où nous

nous sommes placés, le galactose et la glucosamine sont respectivement infermentescibles. Le glucose fermente en présence des oses précédents comme s'il était seul. La fermentation du mannose seul donne un rendement en alcool qui est maximum au bout de 2 heures 30 minutes, comme celle du glucose, mais la quantité d'alcool se formant à partir de ce dernier est sensiblement plus grande. Le mélange de glucose et de mannose se comporte d'une façon très particulière que l'on pourrait expliquer en supposant que le mannose ne fermente qu'après son isomérisation en glucose sous l'action de la levure. L'observation de ces phénomènes complète nos résultats antérieurs sur la fermentation du glucose en solutions très diluées et montre que le dosage des glucides fermentescibles dans un mélange complexe demeure correct si celui-ci contient du glucose en présence de galactose et de glucosamine. Mais la présence de mannose est une source d'erreurs par défaut, fait dont il sera tenu compte dans l'interprétation de nos résultats ultérieurs.

En résumé, nous avons mis au point une technique de dosage du glucose dans une solution à partir de l'alcool formé au cours de la fermentation alcoolique dans des conditions bien déterminées. Nous nous sommes demandé quelles pouvaient être les applications biochimiques d'une telle méthode et tout particulièrement si elle pouvait nous permettre de doser le sucre libre fermentescible du sang. C'est ce problème que nous allons maintenant envisager.

C. *Application de la technique ci-dessus au dosage du sucre libre fermentescible du sang.*

Appliquée au dosage de la glycémie, la technique que nous avons décrit ci-dessus (page 28) doit permettre de décider si le sucre libre du sang donne naissance à une quantité d'alcool correspondant quantitativement ou non au glucose sanguin. Par ailleurs une technique chimique du dosage de la glycémie vraie, non entachée d'erreur due aux substances réductrices non fermentescibles du sang (reste de fermentation), telle que la méthode de HAGEDORN et JENSEN précédée de la déprotéinisation par l'hydrate de cadmium [19], doit trouver sa justification dans une telle recherche. Nous basant sur les essais entrepris lors de l'étude de la fermentation al-

coolique de solutions très diluées de glucose, nous avons adopté la technique suivante :

On ajoute à 25 cm³ de sérum sanguin 0,2 cm³ d'une suspension de 5 g. de levure fraîche des boulangers dans 5 cm³ d'eau salée physiologique et 15 mg. de phosphate diacide de potassium pour amener le pH à 5,6 environ. On place à l'étuve à 37° où on laisse la fermentation évoluer pendant deux heures trente minutes, temps au bout duquel la quantité maxima d'alcool est présente, ainsi que nous l'avons montré. On ajoute alors 50 cm³ d'une solution saturée d'acide picrique pour précipiter les protéines du sérum et on procède au dosage de l'alcool par la microméthode de M. NICLOUX [59]. Pour cela on distille l'alcool au moyen d'un appareil de SCHLÆSING et AUBIN ; on recueille exactement 25 cm³ de distillat dont on prélève 5 cm³ pour le titrage de l'alcool. Il suffit alors de se reporter à la courbe de correspondance entre les quantités d'alcool dosé (exprimées en mg. p. 1.000 cm³) et les concentrations des solutions de glucose (voir figure B page 32) pour obtenir directement la teneur en glucides fermentescibles du sérum sanguin, exprimée en grammes de glucose pour 1.000 cm³. Nous avons comparé les résultats obtenus par la technique ci-dessus, avec les valeurs de la glycémie déterminée sur un même sérum par la méthode de HAGEDORN et JENSEN précédée de la déprotéinisation par l'hydrate de cadmium que nous considérons comme permettant le dosage direct de la glycémie vraie du sucre fermentescible du sang. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau V [22].

TABLEAU V.

Comparaison entre les valeurs de la glycémie dosée à partir de l'alcool résultant de la fermentation du sang et par la méthode de HAGEDORN et JENSEN après déprotéinisation cadmique.

Origine du plasma	Glucose sanguin déterminé (en g. p. 1.000)	
	à partir de l'alcool résultant de la fermentation	par la méthode de HAGEDORN et JENSEN (défécation cadmique)
Porc	1,21	1,23
Porc	0,88	0,91
Cheval	0,56	0,60
Cheval	0,82	0,86
Cheval	0,74	0,78
Cheval	0,94	1,00
Cheval	0,93	0,97
Cheval	0,72	0,75

Il ressort de l'examen de ce tableau que les deux techniques, pourtant très différentes dans leur principe, conduisent à des résultats pratiquement identiques. Les valeurs de la glycémie, déterminées par la méthode chimique utilisée, ont une tendance à être très légèrement supérieures à celles qui résultent du dosage du glucose à partir de l'alcool formé par fermentation du sang. Ces très faibles écarts doivent, à notre avis, être mis sur le compte des erreurs d'expérience. Ces dernières jouent précisément dans le sens des différences observées, puisque le dosage de l'alcool tend à donner des erreurs par défaut de l'ordre de -1 à -2 p. 100 pour le dosage du glucose en solution pure, alors que la méthode de HAGEDORN et JENSEN aurait plutôt tendance à nous donner de faibles erreurs par excès ($+1$ p. 100 au maximum), lesquelles sont l'expression du reste de fermentation pratiquement négligeable que l'on peut trouver dans les filtrats de déprotéinisation cadmique.

III. — Discussion des résultats.

Il ressort de l'ensemble de ces recherches que la fermentation des glucides libres du sérum sanguin par la levure de bière aboutit à la formation d'une quantité d'alcool correspondant exactement à une teneur en glucose de ce milieu identique à la glycémie dosée par la méthode de référence choisie (méthode de HAGEDORN et JENSEN précédée de la déprotéinisation par l'hydrate de cadmium).

La glucidémie vraie doit donc être considérée comme constituée par du glucose, ou tout au moins, par un ensemble de glucides fermentescibles par la levure de bière identiquement à celui-ci. Or ces glucides sont au nombre de trois : le glucose, le mannose et le fructose. La présence de fructose doit être éliminée puisque, au cours d'un travail antérieur, C. DUMAZERT [20] a eu l'occasion de vérifier l'absence de cetohehexose dans le sang. En effet, il a alors montré que le sucre sanguin est bien aldosique puisque les dosages effectués sur un même sang d'individu normal par la méthode de HAGEDORN et JENSEN, laquelle dose en bloc les aldoses et les cétohexoses, et par sa technique iodométrique spécifique des aldoses [19], conduisent à des valeurs identiques. Par ailleurs toutes les tenta-

tives de caractérisation du mannose libre n'ont pas donné de résultats positifs. On peut en dire autant du maltose, diholoside également fermentescible par la levure de bière.

En résumé nous pensons que la totalité des substances glucidiques réductrices du plasma présentes dans les filtrats de déprotéinisation cadmique est entièrement fermentescible et constituée uniquement par du glucose, sans préjuger de la forme isomérique sous laquelle ce dernier est présent dans le sang circulant.

Ajoutons qu'au cours de ces recherches nous avons constaté que le rendement de la fermentation alcoolique, effectué en présence de levure fraîche dans des solutions diluées de glucose, et exprimé par rapport à la quantité d'alcool produite, est très inférieur à celui observé dans le cas des solutions concentrées. Il est d'autant plus faible que les solutions de glucose sont plus diluées ; il atteint, au bout de deux heures trente minutes, un maximum, lequel présente alors une valeur caractéristique pour une concentration donnée en glucose dans les conditions où nous avons opéré. Ces observations nous ont permis de réaliser le dosage du glucose à partir de l'alcool se formant au cours de la fermentation par la levure, technique que nous avons appliquée au dosage de la glycémie. Cette dernière, précise, mais d'une application délicate, car elle exige le respect des conditions de fermentation très strictes, doit être réservée aux travaux de recherche. Elle nous paraît susceptible de rendre des services si on désire doser spécifiquement à l'échelle micro-analytique les constituants fermentescibles d'un mélange de glucides ; mais il faut alors tenir compte du caractère particulier que présente la fermentation du mannose dans de telles conditions et des caractères de la fermentation de divers glucides dans un mélange d'oses ou d'osides. C'est dire que cette méthode ne saurait être appliquée à des cas autres que ceux dont nous nous sommes occupés sans une étude préalable de la fermentation de chaque nouveau mélange. De même l'on ne saurait sans risquer d'erreur extrapoler les résultats obtenus d'une variété de levure à une autre.

DEUXIÈME PARTIE.

Les glucides combinés du plasma sanguin.

INTRODUCTION.

La question des glucides combinés du plasma, quoique aussi importante que celle du sucre libre, a suscité un nombre moins considérable de travaux dont nous ne pouvons donner ici qu'une sommaire revue.

On admet que ces glucides existent à l'état de combinaison avec les protéines sériques et il semble bien qu'ils constituent des groupements prosthétiques associés aux molécules protéiques les plus diverses.

De nombreuses techniques furent successivement employées pour obtenir la dislocation des molécules protéiques, laquelle donne alors naissance à des corps organiques, de constitution beaucoup plus simple (oses et osides). La première en date est celle du chimiste français BRACONNOT qui met en évidence l'hydrolyse que les acides forts imposent à la molécule protéique. Utilisant cette méthode dès 1855 FIGUIER [30] emploie l'acide nitrique et montre qu'un tel hydrolysats fermente au contact de la levure de bière. C'est LEHMANN [48] qui tire les conclusions de ces recherches et admet que le plasma contient une sorte de combinaison glucidique, dont le traitement par l'acide nitrique sépare, par dédoublement, un sucre fermentescible. HABERMANN et HLASIWETZ utilisent l'acide chlorhydrique en solutions concentrées et montrent que la protéine donne alors naissance à une série de corps présentant les caractères analytiques des glucides.

Des expériences semblables exécutées par LÉPINE [42] en 1891 puis par MÖRNER [58] en 1893, permettent à ces auteurs d'arriver à des conclusions identiques. PAVY [62] [63] utilise

d'abord l'acide chlorhydrique, puis l'acide sulfurique, pour obtenir l'hydrolyse des protéines du sang, après précipitation par l'alcool et purification au moyen de l'hydrate d'alumine. EICHHOLTZ [29], après hydrolyse sulfurique du sang, purification et neutralisation par le carbonate de baryum, obtient un liquide limpide qui contient le sucre en solution.

L'hydrolyse est obtenue par ABDERHALDEN, BERGELL et DORPINGHAUS [1] à l'aide de l'acide bromhydrique. Un nouveau procédé d'hydrolyse est ensuite mis au point par MULDER qui montre que les alcalis forts en solutions concentrées ont sur les protéines une action analogue à celle des acides forts. SCHÜTZENBERGER chauffe l'ovalbumine à 200° et en vase clos avec une solution concentrée d'hydrate de baryum. Le résultat obtenu est alors identique à celui produit sur la molécule protéique par les acides forts. Il met ainsi en évidence la formation au cours de l'hydrolyse d'un principe ayant certains caractères des glucides et qu'il appelle « amide cellulosique » et qu'il considère comme très voisin de la cellulose. Reprenant ensuite les travaux de HABERMANN et HLASIWETZ il montre que l'hydrolyse acide conduit également à l'obtention de produits présentant les caractères analytiques des glucides et, en particulier, la réduction de la liqueur cuprique en solution alcaline. Il conclut à l'existence « d'un lien certain entre l'apparition d'un corps cellulosique dans l'expérience de la baryte et d'une matière réductrice dans le dédoublement sulfurique » (*loc. cit.*).

Deux années plus tard LANDWEHR [49] caractérise dans les produits d'hydrolyse de la mucine un corps présentant des caractères très voisins de ceux des dextrines et qu'il considère comme une gomme animale.

Plus tard, S. FRÄNKEL [33] soumet l'albumine de l'œuf à l'hydrolyse acide et met en évidence, dans les produits de dégradation, la présence d'un corps organique ayant des propriétés réductrices sur la liqueur de FEHLING et à laquelle il donne le nom d'« albin » . Il montre aussi que l'hydrolyse acide peut être remplacée par l'action des sucs digestifs qui conduit à l'obtention du même composé. L'étude chimique de cet « albin » le révèle de constitution très voisine de celle de la glucosamine. Enfin S. FRÄNKEL et JELLINEK [34] étudiant de nouveau la question de l'hydrolyse de l'ovalbumine démontrent que cette opération libère du mannose et

de la glucosamine. Ces résultats sont pratiquement en accord avec ceux trouvés par les collaborateurs de LEVENE [55] [56] qui ont essayé d'expliquer le mode de combinaison du mannose et de la glucosamine.

BIGWOOD et VUILLOT [17] trouvent dans les filtrats de défécation de leurs hydrolysats sanguins des quantités considérables de substances réductrices ; ces quantités exprimées en glucose donnent un taux de sucre protéidique de 4 à 5 g. p. 1.000 cm³ de sang. Ces résultats sont certainement trop élevés car la méthode utilisée par ces auteurs (méthode de HAGEDORN et JENSEN après déprotéinisation zincique) est entachée d'erreurs par excès dues à la présence de matières réductrices non glucidiques, libérées au cours de l'hydrolyse du sang. RIMINGTON [66] déclare, pour des raisons identiques, que la méthode de HAGEDORN et JENSEN avec déprotéinisation zincique ne peut pas être appliquée correctement au dosage du sucre protéidique. BIGWOOD et VUILLOT [15] [16] essayent de déterminer la nature exacte des glucides libérés par l'hydrolyse des protéines, en employant la fermentation par la levure de bière ; ces auteurs arrivent à la conclusion que l'hydrolyse des protéines du plasma sanguin libère une très faible proportion de substances réductrices fermentescibles qui, évaluée en glucose, peut atteindre 0,30 à 0,40 g. par litre de sérum sanguin.

LÉPINE, qui a consacré de nombreux travaux à la question des glucides sanguins combinés aux protéines, a cherché à établir qu'il existe dans le sang d'autres glucides que le sucre libre découvert par CLAUDE BERNARD [51]. Cet auteur distingue deux sortes de combinaisons chimiques entre les protéines et les molécules glucidiques : un « sucre fortement combiné » et un « sucre faiblement combiné » qu'il appelle « sucre virtuel ». Pendant plusieurs années LÉPINE a essayé de préciser la nature de ce « sucre virtuel » qu'il a d'abord considéré comme étant du glycogène, puis un mélange de plusieurs pentoses, d'un glucide lévogyre et de maltose [53], puis de deux produits de conjugaison de l'acide glycuronique [53], ensuite comme une sorte de « glycoside » dédoublable en partie par l'invertine et en totalité par l'acide fluorhydrique [52], et enfin « comme un hydrate de carbone susceptible d'être libéré par un segment de vaisseau ou un réseau capillaire rendu exsangue [54] ». Les conclusions de

LÉPINE sont les suivantes : « sucre virtuel veut dire sucre existant en puissance, ayant le pouvoir de servir immédiatement aux besoins de l'organisme. Or si nous avons la preuve que le sucre dédoublable par le ferment (virtuel) est dans ce cas, nous n'avons nullement cette certitude pour le sucre dédoublable par des moyens chimiques violents » (*loc. cit.*). Comme le fait remarquer H. BIERRY la source et la nature du « sucre virtuel » n'ont pas été précisées d'une manière rigoureuse.

H. BIERRY et son école, au cours de nombreux travaux consacrés à cette question, ont montré [6] [7] qu'on trouve toujours dans le sang des animaux du sucre libre et un sucre réducteur, combiné et libérable par hydrolyse, qu'ils appellent « sucre protéidique » [8] [11]. Poursuivant leurs travaux ces auteurs ont cherché à isoler le sucre protéidique pour en révéler la composition. Leurs nombreuses recherches les ont amenés à penser qu'il s'agirait d'un polyoside formé de trois glucides : mannose, glucosamine et galactose qu'ils ont caractérisés par des réactions spécifiques de chacun de ces corps. L. F. HEWITT s'est attaché à caractériser les glucides dans les protéines isolées à l'état pur. Cet auteur a pu ainsi mettre en évidence que certaines protéines du plasma sanguin sont dépourvues de copule glucidique alors que d'autres sont très riches en glucides. En 1936 il a séparé la sérum albumine en deux fractions ; la première ne contient aucun glucide ; la deuxième en contient 8,5 p. 100 ; il a conclu d'autre part que ces glucides sont identifiables à un trisaccharide formé de glucosamine, de galactose et de mannose [39]. Il a proposé le nom de « séroglycoïde » pour cette dernière fraction protéidique [40] qu'il a obtenue à partir du plasma d'Homme, de Cheval, de Bœuf et de Lapin [41]. Poursuivant ses recherches HEWITT est parvenu encore à isoler de la fraction albuminique brute une globuline qu'il a appelé « globoglycoïde » en raison de la présence dans sa molécule de 7,5 p. 100 d'un trisaccharide formé de galactose, de glucose et de glucosamine [42]. Il a indiqué plus tard [43] le moyen d'isoler ce polyoside par une série de digestion du séroglycoïde ou du globoglycoïde avec la pepsine et la trypsine, suivie de la précipitation par l'acétone en milieu acide. Il a étudié enfin l'albumine d'œuf et montré que l'ovomucoïde contient un dioside constitué par du mannose et de la glucosamine alors que l'ovalbumine con-

tient un trioside : le di-mannose-glucosamine [44]. RIMINGTON [66], après de nombreux travaux, a abouti à des conclusions analogues ; cependant il n'a jamais pu caractériser le galactose parmi les produits de dédoublement du sucre protéidique ; il a considéré ce dernier comme étant un disaccharide formé de mannose et de glucosamine. DISCHE [18] a formulé des conclusions analogues à celles d'H. BIERRY. H. BIERRY [11] a également mis au point une technique de semi-microdosage des glucides combinés aux protides dans le sang des animaux. Nous reviendrons d'ailleurs plus tard sur cette question.

H. BIERRY a enfin cherché à préciser le rôle que jouait dans l'organisme ce sucre protéidique, chez les animaux sains et particulièrement chez des sujets atteints de déficience organique telle que le diabète. Nous avons systématiquement laissé de côté cet aspect du rôle physiologique des glucides combinés du sang pour nous occuper plus spécialement de leur dosage, de leur nature et de leur participation à la glycolyse.

D'après cette rapide revue, nous voyons que la nature du sucre protéidique prête encore à discussion. En particulier s'agit-il d'un polyholoside unique et de structure bien définie, comme le pense H. BIERRY, ou bien doit-on distinguer plusieurs fractions dans ce sucre protéidique, comme le croit LÉPINE ? Cette deuxième hypothèse paraît être préférable. En effet on ne saurait accepter l'idée d'un polyoside unique après les travaux récents de M. SÖRENSEN [12]. Le travail de cet auteur porte sur différentes protéines purifiées (sérum-albumine, serum-globuline) dans lesquelles les proportions relatives des glucides, libérés après hydrolyse, sont très variables, selon la protéine considérée, ainsi que le montrent les valeurs que nous rapportons : pour la serum globuline purifiée 1,7 p. 100 de glucosamine et 1,8 p. 100 de glucides non aminés (mannose + galactose) ; pour la serum albumine 0,37 p. 100 de glucosamine et 0,47 p. 100 d'hexoses (mannose + galactose). M. SÖRENSEN conclut que : « d'autres auteurs ont montré que les glucides du sucre protéidique sont constitués par 2 molécules d'hexose et 1 molécule de glucosamine, mais que les résultats ci-dessus mettent en évidence des quantités de glucosamine plus grandes que celles correspondant à ce trisaccharide ».

En outre il n'est pas prouvé — et le contraire est plus rationnel — qu'au cours des variations du taux du sucre protéidique observées dans les cas pathologiques (et en particulier pour les maladies infectieuses) les proportions relatives des constituants varient parallèlement. Au contraire une infection donnée doit faire augmenter spécifiquement un constituant par rapport aux autres, ce que des recherches à entreprendre permettraient peut-être de vérifier.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Nos recherches ont surtout porté :

- A. — Sur le dosage des glucides combinés du plasma sanguin ;
- B. — Sur l'étude de la nature de ces glucides ;
- C. — Sur leur participation à la glycolyse du sang.

I. — Dosage des glucides combinés du plasma sanguin.

Le dosage des glucides combinés du sang comprend nécessairement deux temps principaux, à savoir :

a) *La libération des oses constituant le sucre protéidique par hydrolyse du plasma.*

b) *Le dosage des glucides ainsi libérés par une technique comportant elle-même la déprotéinisation de l'hydrolysât sanguin.*

Avant de pousser plus avant l'exposé de nos recherches personnelles nous devons décrire la méthode de dosage du sucre protéidique d'H. BIERRY [16] que l'on considère, à juste titre, comme la meilleure des techniques en usage.

Méthode d'H. BIERRY pour le dosage du sucre protéidique.

La valeur du sucre protéidique est obtenue par différence entre la quantité de sucre total trouvé après hydrolyse du plasma, et la quantité de sucre libre renfermée dans ce même plasma. Le sang reçu sur du fluorure de sodium en poudre (2 g. de fluorure de sodium p. 1.000 cm³ de sang) est aussitôt centrifugé ; suivant sa richesse en sucre on peut opérer sur 3 cm³, 2 cm³ et même 1 cm³ de plasma.

SUCRE LIBRE. — Au moyen d'une pipette à un seul trait, on mesure 3 cm³ de plasma que l'on introduit dans un ballon jaugé de 25 cm³. On ajoute alors 5 cm³ d'eau distillée environ et on verse, goutte à goutte et en agitant, 3 cm³ de la solution

de nitrate mercurrique (1) [10]. On laisse alors tomber dans le mélange, goutte à goutte et en agitant, de la soude 2 fois normale, jusqu'à ce qu'une goutte du mélange, prélevée avec un fil de platine, colore en violet un papier de bromo-crésol pourpre (2). Le liquide doit encore colorer légèrement en rouge le papier de tournesol. Ce virage correspond sensiblement à pH 6,5. On complète à 25 cm³ (faire tomber la mousse avec une goutte d'éther) et on filtre. On enlève l'excès de mercure en agitant avec de la poudre de zinc. La liqueur filtrée est ensuite mise en contact avec de la tournure de cuivre. Dans ces conditions la démercurisation est totale. On prélève enfin 5 cm³ du filtrat pour le dosage du sucre par le « micro-bertrand ».

SUCRE TOTAL. — Ici également on peut, suivant la richesse en sucre, utiliser 3 cm³, 2 cm³ et même 1 cm³ de plasma. L'hydrolyse est effectuée de la façon suivante : on introduit dans un ballon (de 20 à 25 cm³ de capacité) gradué à 15 cm³ : 3 cm³ de plasma fluoré, 8 cm³ d'eau distillée et 1 cm³ d'acide sulfurique dilué au 1/4 (en volume). On bouche au coton de verre et on porte 30 minutes à l'autoclave à 120°. Si l'on veut doser le sucre protéidique y compris la glucosamine la déprotéinisation sera faite par le procédé suivant :

Déprotéinisation à l'acide phosphotungstique. — Après complet refroidissement de l'hydrolysate on laisse tomber dans le ballon, goutte à goutte, de la solution aqueuse d'acide phosphotungstique à 20 p. 100 de manière à amener le niveau du liquide à 15 cm³ ; on mélange et on laisse en contact. Après centrifugation, la partie aliquote prélevée (10 cm³) est introduite, à l'aide d'une pipette à un trait, dans un petit mortier, puis additionnée de 10 cm³ d'une solution de baryte (43 g. p. 1.000 cm³) mesurés très exactement. On ajoute ensuite 0,40 g. de carbonate de baryum finement pulvérisé et on triture le mélange dans le mortier jusqu'à ce qu'une goutte du liquide, prélevée avec un fil de platine, colore en violet un papier indicateur au bromocrésol pourpre, ce qui correspond à pH 6,5

(1) Dissoudre 400 g. de nitrate mercurrique en plaques dans 700 cm³ d'eau distillée, en chauffant vers 45° et en ajoutant la quantité strictement nécessaire d'acide nitrique. Agiter jusqu'à dissolution complète. Additionner le liquide refroidi de lessive de soude jusqu'à apparition d'un précipité jaune permanent. Compléter à 1.000 cm³ et filtrer.

(2) Tremper des bandes de papier filtre dans une solution de dibromocrésol-sulfone-phthaléine à 4 p. 1.000 dans l'alcool à 60°, puis laisser sécher. Si le papier est de bonne qualité, il reste uniformément coloré en jaune.

environ. Le liquide obtenu après centrifugation est prêt pour le dosage [10]. Si pour ce dosage on emploie une liqueur cuprique qui ne soit pas influencée par la présence d'assez fortes doses de sels, on peut plus simplement opérer ainsi : les 10 cm³, prélevés après addition d'acide phosphotungstique et centrifugation, sont introduits dans le ballon jaugé de 20 cm³, additionnés de soude 2 fois normale jusqu'à virage du papier réactif (bromo-crésol). Le volume est amené à 20 cm³ avec de l'eau distillée. Si l'on ne fait qu'un seul dosage on utilisera l'acide phosphotungstique comme désalbuminant ; si l'on veut évaluer la glucosamine, il sera nécessaire d'effectuer un second dosage sur une deuxième prise d'essai du même plasma, désalbuminé par le nitrate mercurique. Les deux procédés ne s'excluent pas ; ils se complètent. En effet la glucosamine est éliminée au moment de la déprotéinisation mercurique. La différence entre les valeurs trouvées au cours du dosage sur filtrat phosphotungstique et du dosage sur filtrat mercurique provenant d'un même sang, permet l'évaluation de la glucosamine.

Déprotéinisation mercurique [14]. — La partie du plasma hydrolysé, correspondant à 3 cm³ de celui-ci, est introduite dans un ballon jaugé de 25 cm³. On neutralise exactement avec de la soude 2 fois normale (3 cm³ environ), puis on laisse tomber dans le mélange, goutte à goutte et en agitant, 3 cm³ de solution de nitrate mercurique et, enfin, de la soude 2 fois normale, dans les conditions spécifiées plus haut, pour avoir un pH de 6,5 (il faut environ 3 cm³ de soude). On complète à 25 cm³ après avoir fait tomber la mousse avec une goutte d'éther et on filtre. La démercurisation se fait comme précédemment. On prend 5 cm³ pour le dosage par « microbertrand ».

Microbertrand.

Dans un tube conique (pyrex) de centrifugeuse de 10 cm³ de capacité, on introduit 5 cm³ de solution sucrée, puis 2 cm³ exactement mesurés de liqueur cupro-alkaline préparée extemporanément, en mélangeant, avec un agitateur, volumes égaux de liqueurs bleue et blanche (formule G. BERTRAND). Les tubes de centrifugeuse, bouchés légèrement au liège, sont répartis dans les compartiments d'un support métallique et plongés dans l'eau d'un bain-marie bouillant, de façon que la partie du tube remplie de liquide soit immergée. Les tubes

sont maintenus exactement pendant six minutes dans le bain-marie non couvert, puis plongés brusquement avec le support dans l'eau froide. Après refroidissement on centrifuge pendant 2 ou 3 minutes à une vitesse de 2.000 tours environ. On filtre sur amiante en utilisant un appareil semblable à celui de G. BERTRAND, mais de dimensions réduites. La fiole à vide d'une capacité de 70 cm³ environ doit être en verre très blanc pour permettre de bien saisir le virage. Le précipité d'oxydure de cuivre est lavé à trois reprises à l'eau bouillie et chaude, puis dissous dans 3 à 5 cm³ (suivant le besoin) de solution de sulfate ferrique (1). On lave le tube dans lequel la réduction a été obtenue et le filtre d'amiante avec de l'eau distillée à trois reprises, soit 20 cm³ d'eau de lavage environ. On dose ensuite avec une solution exactement titrée de permanganate de potassium versée avec une burette graduée au 1/20^e de cm³. Pour faciliter ce calcul il est commode de préparer une solution de permanganate dont 1 cm³ équivaut à 1 mg. de cuivre (0,60 gr. de permanganate de potassium, eau bi-distillée q. s. p. 1.000 cm³). Cette solution est stable si on a soin d'utiliser pour sa préparation de l'eau bi-distillée dans un appareil en pyrex.

D'après la quantité de permanganate de potassium, utilisée pour transformer le sel ferreux en sel ferrique, on calcule la quantité de cuivre correspondante et, d'après la table ci-dessous, l'équivalent en glucose anhydre.

Table de correspondance entre les quantités de cuivre et les quantités de glucose anhydre.

Glucose en mg.	Cuivre en mg.	Glucose en mg.	Cuivre en mg.
0,0	0,28	1,40	2,95
0,10	0,45	1,50	3,15
0,15	0,60	1,60	3,35
0,20	0,70	1,70	3,50
0,25	0,85	1,80	3,70
0,30	0,90	1,90	3,90
0,40	1,10	2,00	4,10
0,50	1,30	2,25	4,50
0,60	1,50	2,50	4,90
0,70	1,70	2,75	5,30
0,80	1,85	3,00	5,70
0,90	2,05	3,50	6,50
1,00	2,25	4,00	7,30
1,10	2,40	4,50	8,00
1,20	2,60	5,00	8,75
1,30	2,80		

(1) Sulfate ferrique 50 g. ; acide sulfurique 200 g. et eau dist. q. s. p. 1.000 cm³.

H. BIERRY et L. GOIRAN [9] ont indiqué une modification de cette technique permettant de doser des quantités de glucose de 0,10 mg. à 9,2 mg.

Il est évident qu'en Chimie Biologique on a tout intérêt à opérer sur une prise d'essai de sang aussi réduite que possible, d'où l'intérêt d'une méthode d'ordre vraiment micro-analytique. Parmi les techniques de dosage proposées, il semble bien que celle de H. BIERRY soit la seule qui ait fait l'objet d'une étude précise pour sa mise au point ; mais elle exige une prise d'essai de 3 cm³ de plasma. RIMINGTON et d'autres auteurs (BIGWOOD et VUILLOT) ont songé à pratiquer le dosage du sucre protéidique en mettant en œuvre la micro-méthode de HAGEDORN et JENSEN, laquelle présente l'avantage de réduire la prise d'essai à 0,1 cm³ ou 0,05 cm³ de plasma. Malheureusement les résultats ainsi obtenus se sont montrés entachés d'erreurs considérables par excès. Ces dernières sont dues au fait que la déprotéinisation zincique de l'hydrolysât sanguin utilisée par ces auteurs laisse passer dans les filtrats des quantités importantes de substances réductrices de nature non glucidique, libérées au cours de l'hydrolyse du sang. Ces corps jouent donc un rôle analogue à ceux qui sont la cause du « reste de fermentation » dans le dosage de la glycémie libre. Nous avons pensé qu'il suffirait, peut-être, de substituer la déprotéinisation par l'hydrate de cadmium à la déprotéinisation zincique pour appliquer correctement la méthode de HAGEDORN et JENSEN au micro-dosage du sucre protéidique. On sait en effet que, en ce qui concerne le dosage de la glycémie libre, cette microméthode, appliquée au filtrat de déprotéinisation cadmique, permet d'éliminer la totalité des substances réductrices non glucidiques. De ce fait les erreurs dues au « reste de fermentation » sont éliminées. Nous verrons plus loin que la déprotéinisation cadmique nous a permis d'améliorer sérieusement les dosages du sucre protéidique, quand on met en œuvre la méthode de HAGEDORN et JENSEN. C'est pourquoi nous avons adopté cette dernière précédée de la déprotéinisation cadmique pour nos microdosages du sucre protéidique. Elle nous a été très utile pour l'étude de la participation des sucres combinés à la glycolyse.

Ceci étant il nous a fallu mettre au point un processus d'hydrolyse du sang aussi parfaitement adapté que possible à la microméthode sur laquelle nous venons de fixer notre choix et dont on trouvera la justification plus loin. Au cours des

recherches que nous avons entreprises dans ce but, nous n'avons jamais perdu de vue que non seulement la libération des oses doit se faire d'une façon complète, mais aussi qu'elle ne doit pas entraîner leur destruction. Cet ensemble de recherches préliminaires à l'adoption de notre technique doit être exposé avant cette dernière.

A. — *Etude de l'hydrolyse de faibles quantités de plasma (0,05 à 0,1 cm³) en vue du dosage du sucre protéidique.*

Pour nos premiers essais nous nous sommes référés aux travaux de H. BIERRY. Cet auteur réalise la libération des oses du sucre protéidique à l'autoclave à 120° pendant 30 minutes en présence d'acide sulfurique à une concentration voisine de la normalité (le milieu soumis à l'hydrolyse a une richesse en acide sulfurique voisine de 33 g. p. 1.000, soit 0,7 normale sensiblement). Le degré de l'hydrolyse étant sous la dépendance du pH, de la température et de la durée du chauffage, nous avons jugé utile d'étudier l'influence de la concentration, de la force de l'acide et du temps de chauffage sur l'hydrolyse des protéides plasmatiques poursuivie en vue d'obtenir la libération des glucides combinés. Par ailleurs nous avons trouvé plus simple d'opérer toujours au bain-marie bouillant plutôt qu'à l'autoclave.

En résumé nous avons tenu à étudier les actions hydrolysantes d'un acide faible, d'un acide fort en solution diluée et de l'acide sulfurique en solution normale.

1° ETUDE DE L'ACTION DE L'ACIDE ACÉTIQUE 0,2 NORMAL
EN FONCTION DU TEMPS.

Nous avons fait sur un même plasma les essais suivants. Nous avons dosé dans un premier temps le sucre libre par la méthode de HAGEDORN et JENSEN précédée de la déprotéinisation cadmique. Soit A la valeur de la glycémie. Dans un deuxième temps nous avons ajouté 5 cm³ d'une solution d'acide acétique 0,2 normale à 0,1 cm³ de plasma. Après avoir porté au bain-marie bouillant (1), nous avons neutralisé par 5 cm³ de soude 0,2 normale et dosé les glucides totaux (B) par la méthode employée pour le dosage de la glycémie. La différence (B — A) représente la valeur des glucides libérés

(1) On opère dans un tube portant un bouchon entaillé selon une génératrice pour éviter l'évaporation, et le départ de l'acide acétique.

au cours de l'hydrolyse acétique. L'étude de ces valeurs en fonction du temps nous a montré qu'elles croissent rapidement au début, pour atteindre, au bout de 2 heures d'hydrolyse, un maximum auquel elles se maintiennent. Les résultats obtenus au cours de ces expériences sont consignés au tableau VI.

TABLEAU VI.

Quantités de glucides libérés (en g. de glucose p. 1.000 cm³) par action de l'acide acétique 0,2 normal en fonction du temps.

Durée de l'hydrolyse (en heures)	Glucides totaux après hydrolyse (en g. de glucose p. 1.000 cm ³) (a)	Glycémie initiale (en g. de glucose p. 1.000 cm ³) (b)	Glucides libérés par l'hydrolyse au moyen de l'acide acétique 0,2 normal (en g. de glucose p. 1.000 cm ³) (a — b)
30 min.	1,15	0,89	0,26
1 h.	1,23	»	0,34
1 h. 30 min. .	1,30	»	0,41
2 h.	1,47	»	0,58
3 h.	1,47	»	0,58
4 h.	1,48	»	0,59
5 h.	1,46	»	0,57
6 h.	1,45	»	0,56

Il ressort de l'examen de ce tableau que l'acide acétique libère des quantités d'oses croissantes en fonction du temps pendant les deux premières heures de l'hydrolyse. On constate ensuite que le taux des glucides dans le milieu demeure pratiquement constant. On note cependant une légère diminution qui doit être attribuée à la destruction des glucides quand on prolonge trop longtemps l'hydrolyse. Sans doute les oses contribuent-ils alors à former avec les protéines des substances humiques. On peut donc conclure qu'au bout de 2 heures la libération des oses par action de l'acide acétique s'arrête. Notons cependant que la totalité des oses du sucre protéidique n'est pas libérée dans ces conditions, puisque les valeurs du sucre protéidique total, exprimées en g. de glucose p. 1.000 cm³ de plasma, varient de 1,5 g. à 2 g. et plus (voir H. BIERRY [12] et nos résultats p. 66). Cette expérience nous montre donc que certains glucides sont libérables par l'action d'un acide faible, ce qui nous permet de prévoir que la liaison de ces derniers aux protéines sanguines est beaucoup plus lâche que celle qui unit les autres constituants du sucre protéidique aux mêmes corps. Ces glucides

représentent, peut-être, le « sucre faiblement combiné » ou « sucre virtuel » de LÉPINE. Nous discuterons cette hypothèse dans notre chapitre consacré à la nature du sucre protéidique et nous ne retiendrons, pour le moment, que ce fait : *l'hydrolyse du plasma par l'acide acétique permet de libérer spécifiquement certains constituants du sucre protéidique, mais demeure impuissante à mettre en liberté les autres constituants de ce dernier.*

Après avoir mis au point une telle technique pour le dosage de la fraction du sucre protéidique libérable par l'acide acétique 0,2 normal, nous avons cherché à établir la valeur moyenne de cette fraction pour le plasma de différentes espèces animales. Nos résultats ont été rassemblés dans le tableau VII.

TABLEAU VII.

Valeurs de la fraction glucidique du sucre protéidique libérable par l'acide acétique 0,2 normal, selon les différentes espèces animales.

Espèces animales	Glucides totaux après hydrolyse (en g. de glucose p. 1.000 cm ³) (a)	Glycémie initiale (en g. de glucose p. 1.000 cm ³) (b)	Glucides libérés par l'hydrolyse au moyen de l'acide acétique 0,2 normal (en g. de glucose p. 1.000 cm ³) (a — b)
Homme.....	1,41	1,07	0,34
	1,33	0,95	0,38
	1,15	0,80	0,35
	1,29	0,90	0,39
	1,32	0,96	0,36
Lapin.....	1,64	1,34	0,30
	1,57	1,25	0,32
	1,64	1,30	0,34
	1,60	1,31	0,29
Chien.....	1,45	0,90	0,55
	1,35	0,85	0,50
Porc.....	1,30	1,05	0,25
	1,35	1,10	0,25
	1,25	0,98	0,27
	1,21	1,00	0,21
Cheval.....	1,39	0,89	0,50
	1,32	0,86	0,46
	1,36	0,90	0,46
	1,36	0,92	0,44

Ces valeurs montrent que le taux du sucre faiblement combiné est remarquablement constant chez les animaux d'une même espèce.

Ainsi l'action de l'acide acétique, malgré son intérêt, sur lequel nous reviendrons, ne permet pas de libérer la totalité des oses du sucre protéidique ; de ce fait elle ne permet pas le dosage du sucre protéidique *total*. Aussi allons-nous envisager l'action d'un acide fort, et, en particulier, étudier l'hydrolyse du plasma par l'acide sulfurique à diverses concentrations.

2° ETUDE DE L'HYDROLYSE DES GLUCIDES COMBINÉS DU PLASMA PAR L'ACIDE SULFURIQUE EN SOLUTIONS TRÈS DILUÉES.

Nous avons tout d'abord étudié dans quelles conditions la libération des glucides, combinés aux protéines du plasma, pouvait être réalisée par l'emploi d'un acide fort en solutions très diluées.

A cet effet, nous avons fait les essais suivants : nous avons déterminé dans un premier temps la glycémie d'un plasma de cheval (soit A sa valeur) par la méthode de HAGEDORN et JENSEN précédée de la déprotéinisation cadmique. Dans un deuxième temps nous avons soumis 0,1 cm³ du même plasma à l'hydrolyse au moyen de 2 cm³ de la solution au sulfate de cadmium utilisée pour la déprotéinisation du sang au cours de la méthode de HAGEDORN et JENSEN et contenant 60,5 cm³ de solution normale d'acide sulfurique par litre ; en conséquence, l'hydrolyse est alors obtenue par une solution d'acide sulfurique 0,0605 normale. Nous avons porté au bain-marie bouillant pendant un nombre croissant d'heures. Après refroidissement et déprotéinisation par addition de 1 cm³ de soude 0,275 normale nous avons dosé les glucides totaux (soit B leur valeur), dans les mêmes conditions que pour la glycémie. La différence B — A représente la quantité de corps réducteurs mise en liberté par le clivage de la molécule protéique au cours de l'expérience. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII.

Quantités de glucides libérés (en g. de glucose p. 1.000 cm³ de plasma) au cours de l'hydrolyse du plasma au moyen d'un acide fort en solution très diluée et en fonction du temps.

Durée de l'hydrolyse	Glucides totaux après hydrolyse (en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma) (B)	Glycémie initiale (en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma) (A)	Glucides libérés par l'hydrolyse dans les conditions ci-dessus (en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma) (B — A)
15 min.	1,05	1,00	0,05
30 min.	1,18	»	0,18
1 h.	1,30	»	0,30
1 h. 30 min. . .	1,37	»	0,37
2 h.	1,35	»	0,35
2 h. 30 min. .	1,30	»	0,30
3 h.	1,28	»	0,28
3 h. 30 min. .	1,30	»	0,30
4 h.	1,32	»	0,32
4 h. 30 min. .	1,32	»	0,32
5 h.	1,30	»	0,30

De l'examen de ce tableau il ressort que les quantités de glucides, combinés aux protéines d'un plasma de cheval et libérés par l'hydrolyse réalisée au moyen d'un acide fort en solution très diluée, augmentent rapidement en fonction du temps pendant les premières minutes de cette hydrolyse ; elles atteignent un maximum au bout de 1 heure 30 minutes, et accusent enfin une légère diminution.

Plusieurs essais réalisés sur différents plasma de porc ou de cheval nous ont donné des valeurs du même ordre de grandeur, pour la fraction du sucre protéidique libérable dans de telles conditions d'hydrolyse.

Ces résultats sont parfaitement comparables à ceux obtenus par l'hydrolyse acétique du plasma (voir tableau VI) et nous amènent à des conclusions identiques qui peuvent se résumer ainsi : certains glucides sont libérables par l'action des acides forts en solution très diluée, ce qui traduit la faiblesse relative de la liaison qui les unit aux protéines, comparativement à celle qui unit les autres constituants du sucre protéidique. Il y a tout lieu de penser que les glucides libérés par l'acide sulfurique, contenu dans le réactif au sulfate de cadmium (acide sulfurique 0,0605 normal), sont les mêmes que ceux libérés par l'acide acétique en solution 0,2 normale ; en effet

l'action de l'acide sulfurique en solutions aussi diluées est, à certains égards, comparable à celle d'un acide faible tel que l'acide acétique. Ici encore nous ne sommes pas parvenus à libérer complètement les constituants du sucre protéidique. Un tel mode d'hydrolyse ne saurait donc convenir au dosage du sucre protéidique total. La mise en œuvre de l'acide sulfurique en solutions plus concentrées s'impose donc, ce que les travaux d'H. BIERRY permettaient d'ailleurs de prévoir. Nous allons donc étudier l'hydrolyse du plasma par l'acide sulfurique en solution normale, en vue du dosage du sucre protéidique total.

3° ETUDE DE L'HYDROLYSE DES GLUCIDES PLASMATIQUE PAR L'ACIDE SULFURIQUE EN SOLUTION NORMALE.

L'étude de l'hydrolyse du plasma, réalisée au moyen d'un acide faible et d'un acide fort en solution diluée, nous a permis de montrer que la totalité des glucides combinés n'est pas libérée dans de telles conditions. Nous avons essayé d'obtenir la mise en liberté complète des glucides combinés en augmentant progressivement les quantités d'acide sulfurique utilisées au cours de l'expérience.

Pour cela nous avons dosé dans un premier temps la glycémie d'un plasma de cheval. Dans un deuxième temps nous avons soumis diverses prises de 0,05 cm³ (1) du même plasma à l'hydrolyse au moyen de 2 cm³ d'une solution normale d'acide sulfurique, et nous avons maintenu le mélange au bain-marie bouillant pendant des temps variables. Après refroidissement et neutralisation par 2 cm³ de solution normale de soude on procède à la déprotéinisation par l'hydrate de cadmium et au dosage. Par ailleurs, toujours sur le même sérum, nous avons étudié la libération des oses du sucre protéidique en faisant agir 5 cm³ d'une solution normale d'acide sulfurique sur des prises d'essai de 0,05 cm³ du même plasma. Les valeurs obtenues au cours de ces expériences sont consignées au tableau IX ; ces essais ont été réalisés sur un plasma de cheval de glycémie initiale égale à 1,02 g. de glucose p. 1.000 cm³ de plasma.

(1) Nous avons choisi une telle prise d'essai (0,05 cm³) car la valeur des glucides totaux que nous aurons à doser après hydrolyse sera le plus souvent voisine de 0,3 mg. et pourra même atteindre 0,4 mg., zone dans laquelle la méthode de HAGEDORN et JENSEN perd de sa précision ; au contraire en opérant sur 0,05 cm³ de plasma le dosage portera rarement sur plus de 0,2 mg.

TABLEAU IX.

Quantités de glucides libérés (en g. de glucose p. 1.000 cm³ de plasma) au cours de l'hydrolyse du plasma au moyen de l'acide sulfurique en solution normale et en fonction du temps.

Durée de l'hydrolyse	Glucides libérés par l'action hydrolysante de 2 cm ³ d'acide sulfurique normal (en g. de glucose p. 1.000)	Glucides libérés par l'action hydrolysante de 5 cm ³ d'acide sulfurique normal (en g. de glucose p. 1.000)
	—	—
1 h.	2,16	2,24
1 h. 30 min. ...	2,30	2,26
2 h.	2,32	2,28
2 h. 30 min. ...	2,30	2,25
3 h.	2,25	2,20

Les résultats consignés dans ce tableau ont été calculés en soustrayant la valeur de la glycémie libre du plasma mis en œuvre de celle des glucides totaux (exprimés en g. de glucose p. 1.000 cm³ de plasma) dosés après hydrolyse. De l'examen de ces résultats il ressort que la libération totale des oses du sucre protéidique nécessite la mise en œuvre d'un acide fort en solution normale. Le volume de ce dernier est sans influence sur le processus d'hydrolyse, si ce n'est toutefois qu'un excès considérable présente l'inconvénient de détruire plus rapidement les oses au fur et à mesure de leur libération. L'emploi de 2 cm³ d'acide sulfurique en solution normale ne conduit à une destruction notable des glucides libérés que si l'on prolonge la durée de l'hydrolyse au-delà de 3 heures.

En résumé par l'action de l'acide sulfurique en solution normale, utilisé dans la proportion de 2 cm³ pour 0,05 cm³ de plasma, on obtient la libération complète des oses constituant le sucre protéidique au bout de 2 heures de chauffage au bain-marie bouillant. Ce temps peut être porté jusqu'à 2 heures 30 minutes sans que l'on observe une destruction notable des glucides libérés. Ces résultats se trouvent d'ailleurs confirmés par la comparaison des valeurs obtenues par un tel procédé avec celles résultant du dosage pratiqué par la méthode de H. BERRY (voir p. 62). C'est à la suite de ces recherches que nous avons adopté, pour le dosage du sucre protéidique total, la technique de microdosage que nous allons décrire en détails.

B. — Technique du microdosage du sucre protéidique total proposée.

La glycémie initiale est dosée par la méthode de HAGEDORN et JENSEN. Soit A sa valeur. Le microdosage du sucre protéidique est réalisé de la manière suivante : dans un tube à essais, d'une longueur de 15 cm. environ et muni d'un petit bec, on introduit 2 cm³ du réactif suivant :

Sulfate de cadmium crist. pur	13 g.
Acide sulfurique 2 fois normal	530,25 cm ³
Eau distillée q. s. p.	1.000 cm ³

Ainsi nous introduisons par une mesure volumétrique unique à la fois le réactif qui servira ultérieurement à la déprotéinisation et la quantité d'acide sulfurique nécessaire à l'hydrolyse (équivalente à 2 cm³ de solution normale d'acide sulfurique). On ajoute 0,05 cm³ de plasma mesuré avec les précautions d'usage et on porte au bain-marie bouillant pendant 2 heures [25], après avoir agité avec une petite baguette de verre. On laisse refroidir et on ajoute alors peu à peu, et en agitant, 1 cm³ d'une solution de soude 2,275 normale, laquelle permet à la fois la neutralisation de l'acide introduit pour l'hydrolyse et la précipitation de l'hydrate de cadmium qui assure la déprotéinisation. On filtre (sur papier filtre sans cendres) et on lave le précipité à trois reprises avec chaque fois 2 à 3 cm³ d'eau distillée. On recueille le filtrat et les eaux de lavage dans un gros tube à centrifuger en vue du dosage par la méthode de HAGEDORN et JENSEN. Le filtrat doit être parfaitement limpide, incolore et neutre au papier de tournesol. Soit B la valeur des glucides totaux ainsi trouvée et exprimée en grammes de glucose par litre de plasma. La différence B — A (sucres totaux moins sucre libre) représente la quantité, exprimée en g. de glucose p. 1.000 cm³ de plasma, de glucides réducteurs combinés aux protéines et mis en liberté par l'hydrolyse, dans les conditions où nous nous sommes placés.

C. — Justification de la microméthode proposée pour le dosage du sucre protéidique total.

La technique que nous venons de décrire présente donc l'avantage considérable de permettre l'utilisation de prises d'essais réduites à 0,05 cm³ de plasma. Nous ne saurions

cependant la préconiser sans avoir tout d'abord discuté de la valeur des résultats qu'elle est susceptible de fournir.

Signalons, avant tout, qu'il importe d'opérer toujours sur des prises d'essais identiques, si l'on veut avoir des résultats comparables entre eux. En effet, c'est arbitrairement que l'on exprime les glucides combinés du sang en glucose alors que le dosage porte sur un mélange d'oses dont les pouvoirs réducteurs respectifs diffèrent de celui du glucose, ce qui explique que les résultats ne soient pas rigoureusement proportionnels à des prises d'essais différentes. Pour la même raison le résultat trouvé n'exprime pas le poids réel de glucide. Par ailleurs, la question de savoir si l'on ne dose que des glucides reste à vérifier. Nous nous trouvons ici dans des conditions comparables à celles où se sont trouvés les premiers chercheurs qui se sont proposé de doser la glycémie libre. Ces derniers dosaient dans leurs filtrats de déprotéinisation l'ensemble des substances réductrices qui s'y trouvaient contenues. De nombreux travaux ont été nécessaires, soit pour éliminer les substances non glucidiques par des procédés de défécation convenablement adaptés à ce but, soit pour trouver un réactif oxydant aussi spécifique que possible du glucose sanguin. En ce qui concerne le dosage du sucre protéidique il est certain que la technique que nous avons mise en œuvre bénéficie de toutes ces recherches ; cependant il n'en demeure pas moins que des contrôles supplémentaire pourront seuls décider de la spécificité relative de la technique que nous proposons. Le caractère essentiel de notre microméthode réside dans sa fidélité. Les valeurs obtenues sont parfaitement comparables entre elles, à la condition toutefois d'opérer sur la même prise d'essai. Ce résultat est des plus importants car la fidélité d'une méthode est la qualité essentielle exigée par certaines expériences biochimiques qui ont surtout pour but de suivre les variations de la substance que l'on dose.

Il nous a paru intéressant de comparer les résultats obtenus par la mise en œuvre de notre microméthode avec ceux que nous fournit la technique d'H. BIERRY. Pour cela nous avons effectué une série de dosages sur un même plasma par notre microméthode, d'une part et par la technique d'H. BIERRY, d'autre part. Les résultats de cette expérience sont contenus dans le tableau X ci-dessous.

TABLEAU X.

Valeurs obtenues, pour le sucre protéidique (en g. de glucose p. 1.000 cm³ de plasma) d'un même plasma de cheval, par notre microméthode et par la technique d'H. BIERRY.

1° PAR NOTRE MICROMÉTHODE.

	Glycémie libre déterminée par la méthode de HAGEDORN et JENSEN (déprotéinisation cadmique) (en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma) (a)	Glucides totaux, après hydrolyse, dosés par notre microméthode (en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma) (b)	Sucre protéidique (exprimé en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma) (b — a)
1 ^{er} essai	1,05	3,58	2,53
2 ^e essai	»	3,74	2,69
3 ^e essai	»	3,72	2,67
4 ^e essai	»	3,71	2,66
5 ^e essai	»	3,74	2,69

2° PAR LA MÉTHODE D'H. BIERRY.

	Glycémie libre déterminée par le microbertrand (en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma) (a)	Glucides totaux après hydrolyse dosés par la mé- thode d'H. BIERRY (en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma) (b)	Sucre protéidique (en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma) (b — a)
1 ^{er} essai	1,15	3,90	2,75
2 ^e essai	»	4,29	3,14
3 ^e essai	»	4,60	3,45
4 ^e essai	»	4,12	2,97
5 ^e essai	»	4,29	3,14

En outre nous avons jugé intéressant de comparer les résultats auxquels conduisent, d'une part, la méthode d'H. BIERRY et, d'autre part, notre technique en opérant sur les mêmes plasmas provenant de divers animaux. Les résultats obtenus sont consignés au tableau XI.

TABLEAU XI.

Comparaison des valeurs du sucre protéidique obtenues, d'une part, par la méthode d'H. BIERRY et, d'autre part, par notre microméthode (ces valeurs sont exprimées en g. de glucose p. 1.000 cm³ de plasma).

Plasma de l'espèce animale	Glycémie libre dosée par micro- bertrand	Glycémie libre dosée par HAGEDORN et JENSEN	Sucre protéique dosé par la méthode d'H. BIERRY	Sucre protéique dosé par notre micro- méthode
Porc	1,62	1,29	2,98	2,45
»	0,89	0,84	2,68	2,58
»	1,19	1,08	2,73	2,46
»	1,16	1,05	2,96	2,80
»	1,20	1,12	3,05	2,75
Cheval . . .	1,08	0,93	3,00	2,79
» . . .	1,21	1,04	3,05	2,40
» . . .	1,15	1,05	2,97	2,69
» . . .	1,08	1,00	2,89	2,70
» . . .	1,09	1,02	2,64	2,50
» . . .	1,02	0,84	2,92	2,60

Il ressort de l'examen du tableau X que notre microméthode, appliquée à un même sérum, nous donne des valeurs pour le sucre protéidique (exprimées en g. de glucose p. 1.000 cm³ de plasma) oscillant entre 2,53 et 2,69, alors qu'avec la méthode d'H. BIERRY nous obtenons des résultats variant entre 2,75 et 3,45. Nous pouvons en conclure à une fidélité très satisfaisante de notre technique.

Par ailleurs, les valeurs, pour le sucre protéidique, consignées au tableau XI nous montrent que nous obtenons toujours des résultats du même ordre de grandeur, mais sensiblement inférieurs à ceux fournis par la méthode d'H. BIERRY. On pourrait les expliquer, à première vue, par les différences du pouvoir réducteur que peuvent présenter les divers oses constituant le sucre protéidique vis-à-vis, d'une part, du réactif cupro-alcalin et, d'autre part, du ferri cyanure de potassium. Cependant il se pourrait aussi que ces écarts proviennent d'une imperfection des procédés de déprotéinisation de l'une ou de l'autre méthode. Aussi avons-nous jugé utile de vérifier si la déprotéinisation par l'hydrate de cadmium suffit à une déprotéinisation correcte et, en particulier, si elle permet d'éliminer les dérivés sulfurés (glutathion, cystine, etc...) susceptibles de prendre naissance au cours de l'hydrolyse et qui, par leur intense pouvoir réducteur, pourraient être la cause d'erreurs

importantes(voir DUMAZERT [19]. Dans ce but, nous avons essayé d'étudier son influence sur les dosages du sucre protéidique en ajoutant du glutathion au plasma avant hydrolyse. A 0,1 cm³ de plasma nous avons ajouté 1 cm³ d'une solution de glutathion à 0,30 g. p. 100 cm³ d'eau (soit à une concentration 10 fois supérieure environ à celle du glutathion dans le sang) et après hydrolyse nous avons mesuré le pouvoir réducteur par notre méthode ; nous avons constaté que celui-ci, exprimé en grammes de glucose par litre de plasma, atteint une valeur de 3,46 g. alors que la somme des glucides totaux, dosés par ailleurs sur le même plasma, avant addition de glutathion, est égale à 3,32 g. Il s'ensuit une différence exprimée en g. de glucose égale à 0,24 g., ce qui traduit l'introduction d'une erreur de 6 p. 100 pratiquement négligeable si l'on considère que la quantité de glutathion ajoutée est 10 fois supérieure à celle que peut contenir un sang normal et que le glutathion se trouve presque totalement dans les globules.

Il semble donc que des imperfections dues à la déprotéinisation par l'hydrate de cadmium ne puissent pas constituer une source d'erreur importante.

Nous nous sommes alors demandé si les écarts entre la méthode d'H. BIERRY et la nôtre pouvaient être expliqués par les procédés d'oxydation des glucides utilisés. A cet égard l'oxydation par le ferricyanure de potassium ne saurait être mise en cause. Il n'en est pas de même pour le réactif cupro-alcalin utilisé à l'échelle micro-analytique. On sait en effet que si la méthode de G. BERTRAND est d'une très grande précision à l'échelle macro-analytique son application en micro-analyse (méthode de SAINT-RAT dite microbertrand) conduit à des résultats imparfaits (voir BAUDOIN [4] à moins qu'elle ne soit modifiée par des procédés analytiques spéciaux, tels que ceux décrits, par exemple, par FONTÈS et THIVOLLE [32].

Il suffit de comparer, en particulier, les valeurs des glycémies libres consignées au tableau XI pour se rendre compte que les résultats obtenus par le microbertrand sont toujours plus élevés que ceux fournis par la micro-méthode de HAGEDORN et JENSEN. Les procédés de déprotéinisation mis en œuvre dans les deux cas sont tous deux excellents ; il ne reste plus pour expliquer les écarts constatés que d'imputer au microbertrand les résultats plus élevés obtenus au moyen de la

technique mise en œuvre par H. BIERRY, puisqu'il a été démontré, par ailleurs, que la méthode de HAGEDORN et JENSEN, précédée de la déprotéinisation cadmique, permet le dosage de la glycémie vraie avec une précision de 1 à 2 p. 100 (DUMAZERT [19]).

Les résultats obtenus par notre méthode sont sensiblement en accord avec ceux fournis par la méthode d'H. BIERRY considérée par beaucoup d'auteurs comme la méthode de référence de dosage du sucre protéidique. Aussi les résultats obtenus par la mise en œuvre de notre micro-méthode pourront-ils être, à l'occasion, comparés sans trop de difficultés à ceux fournis par la méthode d'H. BIERRY, grâce à laquelle de nombreuses notions biologiques et physiologiques ont déjà été acquises sur la nature et le rôle du sucre protéique à une époque où la micro-méthode de HAGEDORN et JENSEN n'existait pas.

En résumé la micro-méthode que nous proposons apporte un perfectionnement au dosage du sucre protéidique. Ses avantages résident : 1° dans la possibilité d'opérer à l'échelle vraiment micro-analytique, puisque la prise d'essai se trouve réduite à 0,05 cm³ de plasma ; 2° dans une fidélité satisfaisante pour des recherches biologiques.

Ces avantages justifient l'usage que nous avons fait de cette technique pour poursuivre nos recherches sur la nature des glucides constituant le sucre protéidique.

II. — Nature des glucides combinés du plasma sanguin.

Nous venons d'exposer la plupart des moyens que nous allons mettre en œuvre pour étudier la nature des glucides combinés du plasma sanguin. Nos recherches ont porté essentiellement sur les questions suivantes :

I. — Le sucre protéidique est-il constitué par un polyoside unique ainsi que le pense H. BIERRY ou bien faut-il distinguer plusieurs fractions glucidiques distinctes, dont l'ensemble constituerait le sucre protéidique ?

II. — Nous avons cherché à établir si certains de ces glucides étaient fermentescibles sous l'action de la levure de bière ; nous avons ensuite cherché à les doser.

Examinons successivement chacun de ces sujets.

A. — *Sur l'existence d'au moins deux fractions distinctes parmi les glucides combinés du sang.*

Au cours de nos recherches antérieures nous avons montré que certains constituants glucidiques du sucre protéidique sont libérables sous l'action des acides faibles, tels que l'acide acétique, ou de l'acide sulfurique en solution très diluée, alors que d'autres ne sont libérés que sous l'action de l'acide sulfurique en solution normale. Ce fait peut être interprété de deux façons :

1° ou bien certains oses du sucre protéidique sont plus facilement libérables tout en faisant partie d'un même polyside ;

2° ou bien les glucides libérables par l'acide acétique constituent une fraction distincte parmi les glucides combinés du sang. Dans ce cas une autre fraction indépendante de celle-ci serait représentée par les glucides libérables seulement par l'acide sulfurique en solution normale.

Dans le but de savoir laquelle de ces interprétations est exacte, nous avons dosé sur un même plasma : 1° la glycémie libre (a) ; 2° les glucides totaux après l'hydrolyse du plasma au moyen de l'acide acétique en solution 0,2 normale (b), (voir page 52) ; 3° les glucides totaux, libérés au cours de l'hydrolyse sulfurique du plasma, par la micro-méthode que nous avons proposée pour le dosage du sucre protéidique (c). Le taux de ces divers glucides est exprimé en glucose (g. p. 1.000 cm³ de plasma) dans tous les tableaux ci-dessous comme dans les précédents ; les valeurs de glucides libérés par l'hydrolyse au moyen de l'acide acétique sont calculées en retranchant le taux de la glycémie libre de celui des glucides totaux b dosés après cette hydrolyse, soit $b - a$; de même les valeurs du sucre protéidique sont calculées en retranchant le taux de la glycémie libre de celui des glucides totaux (c) dosés par notre micro-méthode, après l'hydrolyse sulfurique du plasma, soit $c - a$. Ceci étant, nous avons comparé ces diverses valeurs obtenues à partir d'un même plasma. Les résultats obtenus se trouvent au tableau XII ci-dessous [26].

TABLEAU XII.

Comparaison entre les valeurs obtenues, à partir d'un même plasma, pour les glucides libérables par l'acide acétique en solution 0,2 normale et pour le sucre protéidique.

Plasma de l'espèce animale	Glycémie libre par la méthode de HAGEDORN et JENSEN (en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma)	Glucides libérés par l'hydrolyse acétique (en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma)	Valeurs du sucre protéidique dosé par notre micro-méthode (en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma)
Homme.....	1,07	0,32	2,05
	0,98	0,34	2,32
	0,95	0,37	2,48
	0,90	0,38	2,32
	0,94	0,36	2,54
	0,99	0,35	2,50
Cheval.....	0,75	0,50	2,75
	0,68	0,44	2,44
	0,79	0,43	2,35
	1,09	0,46	3,15
	1,06	0,46	2,74
	0,80	0,48	2,95
	0,86	0,45	2,38
	0,72	0,49	2,00
	0,84	0,47	2,70
	0,76	0,46	1,85
	1,10	0,44	3,05
Porc.....	1,13	0,21	2,82
	1,12	0,27	2,90
	1,16	0,29	1,72
	1,06	0,29	2,53
	0,95	0,32	2,55
	1,02	0,26	2,75
	1,06	0,28	1,96
	1,00	0,31	2,70
Lapin.....	1,34	0,30	2,62
	1,25	0,32	2,85
	1,30	0,34	1,90
	1,31	0,29	2,75

L'examen du tableau XII nous permet les conclusions suivantes :

1° Le sucre libéré par l'hydrolyse au moyen de l'acide acétique présente des valeurs assez constantes pour chaque espèce animale.

2° Par contre il n'en est pas de même pour le sucre protéidique dont le taux, soit brut soit après défalcation des glucides

libérés par acétolyse, présente d'importantes variations pour divers sujets d'une même espèce.

3° Les variations du taux des glucides libérés par l'hydrolyse acétique sont *toujours indépendantes* de celles du taux du sucre protéidique.

Ces recherches nous ont donc permis de mettre en évidence deux fractions de glucides combinés du sang : 1° une partie faiblement combinée, puisque libérable par les acides faibles ; 2° une partie fortement combinée libérable seulement par l'acide sulfurique en solution normale. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de LÉPINE, lequel distingue deux sortes de combinaisons chimiques entre les protéides et les glucides sanguins : un « sucre fortement combiné » et un « sucre faiblement combiné » qu'il appelle « sucre virtuel ». Nous pensons que la technique de dosage des glucides libérés par acétolyse (voir p. 52) permet le dosage précis du « sucre virtuel » de LÉPINE.

Pour préciser davantage la nature des glucides combinés du sang nous avons étudié leurs caractères de fermentescibilité sous l'action de la levure.

B. — *Etude de la fermentescibilité des glucides constituant le sucre protéidique.*

Après avoir distingué deux fractions parmi les glucides combinés du sang, nous avons étudié successivement comment chacune d'elles se comporte quand on la soumet à la fermentation alcoolique.

1° ETUDE DE LA FERMENTESCIBILITÉ DES GLUCIDES LIBÉRABLES PAR LES ACIDES FAIBLES.

Cette étude a été réalisée en comparant les valeurs des glucides libérés par les acides faibles et dosés, d'une part, par la technique que nous avons exposée plus haut (voir p. 52) et, d'autre part, à partir de l'alcool formé au cours de la fermentation. Pour cela nous avons fait les expériences suivantes sur un même plasma. Nous avons dosé dans un premier temps les glucides libérés par l'hydrolyse au moyen de l'acide acétique en solution 0,2 normale et, dans un deuxième temps, nous avons soumis 10 cm³ de plasma à l'hydrolyse

au moyen de 100 cm³ d'acide acétique en solution normale dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux, au bain-marie bouillant pendant deux heures. Au bout de ce temps, nous avons neutralisé par une solution de soude en utilisant comme indicateur un papier au rouge de méthyle et en opérant à la touche ; après évaporation du liquide à 25 cm³ sous pression réduite nous avons soumis le milieu à la fermentation alcoolique dans les conditions exposées plus haut (page 28). Les résultats obtenus calculés comme précédemment, sont inscrits au tableau XIII. Rappelons qu'il suffit de se reporter à la courbe de la figure B (p. 32) pour obtenir la quantité d'alcool correspondant à la valeur de la glycémie libre.

TABLEAU XIII.

Comparaison entre les valeurs des glucides libérés par les acides faibles dosés, d'une part, par notre technique exposée plus haut (p.) et, d'autre part à partir de l'alcool produit au cours de leur fermentation.

Plasma de	Glycémie initiale (a)	Glucides totaux après hydrolyse (en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma) (b)	Alcool total dosé après fermentation de l'hydrolysât (en g. p. 1.000)	Glucides libérés par l'hydrolyse acétique (en g. de glucose p. 1.000) (b — a)	Sucre fer- mentescible dosé à partir de l'alcool (en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma)
Porc ...	0,86	1,09	0,270	0,23	0,25
» ...	1,00	1,28	0,331	0,28	0,28
» ...	1,10	1,41	0,370	0,31	0,28
» ...	0,96	1,26	0,306	0,30	0,27
» ...	1,03	1,30	0,334	0,27	0,26
» ...	1,17	1,40	0,366	0,23	0,21

Les résultats de ce tableau mettent en évidence le fait que les *glucides libérables par les acides faibles* (tels que l'acide acétique en solution 0,2 normale) *sont entièrement fermentescibles dans les conditions où nous nous plaçons*. En effet nous constatons une identité presque absolue entre les valeurs de la fraction glucidique faiblement combinée obtenues par dosage chimique d'une part, et à partir de l'alcool dosé sur l'hydrolysât acétique après fermentation, d'autre part. Par ailleurs, nous pouvons affirmer également que les glucides constituant le sucre faiblement combiné ne sont fermentescibles qu'après hydrolyse puisque nous avons montré au cours de nos recherches antérieures (voir p. 38) que seule une quan-

tité d'alcool correspondant strictement à la valeur de la glycémie libre pouvait être obtenue par fermentation directe du plasma. De plus nous avons vérifié que cette fraction glucidique ne fermente qu'après avoir été libérée par l'hydrolyse. Pour cela nous avons fait les expériences suivantes : nous avons dosé la glycémie libre (méthode de HAGEDORN et JENSEN après déprotéinisation à l'hydrate de cadmium) et les glucides libérables par acétolyse d'un plasma de cheval. Après fermentation complète de ce plasma nous avons effectué les mêmes dosages. Voici les résultats obtenus au cours de deux contrôles :

	Avant fermentation		Après fermentation complète	
	Glycémie libre (g. de glucose p. 1.000 cm ³)	Glucides libérables par acétolyse (g. de glucose p. 1.000 cm ³)	Glycémie libre (g. de glucose p. 1.000 cm ³)	Glucides libérables par acétolyse (g. de glucose p. 1.000 cm ³)
1 ^{er} essai..	0,76	0,34	0,03	0,35
2 ^e essai..	0,82	0,36	0,02	0,40

Nous voyons donc que les glucides faiblement combinés ne subissent la fermentation qu'après l'hydrolyse du plasma.

2° ETUDE DE LA FERMENTESCIBILITÉ DES GLUCIDES LIBÉRÉS PAR L'HYDROLYSE AU MOYEN DE L'ACIDE SULFURIQUE EN SOLUTION NORMALE.

Après avoir envisagé la fermentescibilité de la fraction glucidique libérée par les acides faibles nous avons soumis à la fermentation alcoolique les hydrolysats sulfuriques du plasma et nous avons dosé l'alcool formé par la microméthode de M. NICLOUX. Pour cela nous avons fait l'expérience suivante : 10 cm³ de plasma additionnés de 40 cm³ d'acide sulfurique en solution normale sont maintenus pendant deux heures au bain-marie bouillant, dans le but d'obtenir la libération de tous les glucides constituant le sucre protéidique. Après refroidissement on élimine l'acide sulfurique par addition de 6 g. de carbonate de baryum ; on porte ensuite à l'ébullition, on filtre et on lave trois ou quatre fois le précipité avec, au total, 150 cm³ d'eau distillée bouillante en recueillant les eaux de lavage. Le filtrat, qui doit être neutre, est évaporé à 25 cm³ exactement, à 60° C. et sous pression réduite. Sur ce résidu

on dose spécifiquement la totalité des oses fermentescibles à partir de l'alcool formé sous l'action de la levure d'après la technique que nous avons décrite antérieurement [22] [23]. En soustrayant de ce résultat la glycémie libre, on obtient la quantité d'oses fermentescibles faisant partie des glucides combinés du sang. Ceci étant, nous avons dosé par cette technique les doses fermentescibles et par notre microméthode le sucre protéidique dans un même plasma. Les résultats obtenus sont consignés au tableau XIV.

TABLEAU XIV.

Comparaison entre les valeurs du sucre protéidique total et des oses fermentescibles de ce sucre protéidique dosés à partir de l'alcool produit par leur fermentation.

Plasma de l'espèce	Valeurs du sucre protéidique total (1) (en g. de glucose p. 1.000 cm ³ de plasma)	Glucides fermentescibles du sucre protéidique dosés à partir de l'alcool produit par leur fermentation (en g. de glucose p. 1.000)
Cheval	2,29	0,38
»	2,35	0,43
»	2,44	0,44
»	2,74	0,46
»	3,00	0,44
»	3,15	0,46
Porc	1,72	0,29
»	2,53	0,29
»	2,55	0,32
»	2,82	0,31
»	2,92	0,34

Ces résultats, en accord avec ceux de BIGWOOD et VUILLOT [16], nous montrent que les valeurs des glucides fermentescibles du sucre protéidique total sont à peine un peu plus élevées que celles des glucides libérés par l'hydrolyse acétique, à tel point que l'on pourrait conclure ici que ce sucre fermentescible se confond avec celui libéré par acétolyse et que l'acide sulfurique ne libère aucun ose fermentescible. Cependant le sucre protéidique renferme du mannose (1/3 du polyoside d'H. BIERRY) que nous ne retrouvons pas par nos dosages. Il ne saurait être question de nier l'existence de ce dernier surtout si l'on se rappelle les caractères particuliers de la fer-

(1) La valeur des glucides libérés par les acides faibles n'est pas retranchée.

mentation des solutions diluées de mannose, caractères qui peuvent se modifier quand on opère en milieu complexe. Par ailleurs, il est possible que le mannose ait pu être adsorbé au cours des opérations de neutralisation de l'hydrolysât sulfurique par le carbonate de baryum. Les événements nous ont empêché de contrôler ce fait en ajoutant au plasma du mannose et en cherchant à le retrouver après avoir fait subir au plasma toutes les opérations décrites ci-dessus. Par conséquent, jusqu'à plus ample informé, on ne peut formuler de conclusions précises sur la nature des oses fermentescibles libérées par l'acide sulfurique.

Poursuivant nos recherches sur la nature des glucides combinés du sang nous nous sommes occupés de la glucosamine qui est un des glucides entrant dans la constitution du sucre protéidique (H. BIERRY [12], M. SÖRENSEN [72]).

RECHERCHE DE LA GLUCOSAMINE.

Il nous a été possible de vérifier que les oses libérés par l'acide sulfurique contiennent de la glucosamine en utilisant la réaction colorée en rouge que donne cet amino-glucide avec la para-diméthyl-amino-benzaldéhyde après condensation à 100° C. avec l'acétyl-acétone en milieu carbonaté. Nous avons tenté quelques dosages de la glucosamine par la méthode de I. NILSSON [61] ; mais nous nous sommes rapidement rendu compte que cette méthode est très infidèle et donne souvent des erreurs par excès considérables. Nous ne saurions relater les résultats de nos dosages pour en faire état en ce qui concerne la nature du sucre protéidique et nous nous bornerons à signaler que les variations du taux de la glucosamine nous ont paru suivre avec un parallélisme assez net les variations du taux du sucre protéidique libéré par l'hydrolyse sulfurique diminué de la fraction glucidique libérée par acétolyse. Par ailleurs, il est probable que la glucosamine représente sensiblement plus du tiers de la fraction glucidique qui la contient, ce que les récentes recherches de SÖRENSEN [72] semblent devoir également démontrer. Les seules conclusions certaines que nous puissions formuler sont qu'il n'y a pas de glucosamine libre dans le sang, que la glucosamine du sucre protéidique n'est pas libérée par acétolyse et que, par conséquent, son apparition demeure le fait de l'acide sulfurique en solution normale.

Nous pouvons conclure de l'ensemble de ces recherches sur la nature des glucides combinés du sang à l'existence d'au moins deux fractions parmi ces derniers :

1° une fraction libérable par les acides faibles ou par les acides forts très dilués ; il s'agit donc d'une fraction glucidique faiblement combinée. Cette dernière est entièrement fermentescible. Nous croyons pouvoir l'identifier au « sucre virtuel » de LÉPINE.

2° une fraction constituée par des glucides libérables seulement par un processus d'hydrolyse mettant en œuvre l'acide sulfurique en solution normale. Cette fraction est donc caractérisée par le fait qu'elle est fortement combinée aux protides sanguins. Les oses qui la constituent contiennent de la glucosamine ; ils ne se sont pas révélés comme comprenant des glucides fermentescibles dans les conditions où nous nous sommes placés.

Ces deux fractions sont très certainement distinctes l'une de l'autre, puisque les glucides libérés par acétolyse présentent un taux très sensiblement constant pour une espèce donnée, alors qu'au contraire le taux des glucides libérés par l'hydrolyse sulfurique, défalcation faite des premiers, présente des valeurs extrêmement variables.

Par conséquent nous sommes amenés à admettre qu'il n'existe pas un polyholoside unique copulé aux protéines. H. BIERRY a isolé un trioside de structure bien définie, constitué par de la glucosamine, du glucose et du mannose. Mais il ne semble pas que ce polyholoside soit le seul. Les recherches poursuivies par divers auteurs (M. SÖRENSEN, C. RIMINGTON) ont montré que selon la protéine envisagée le polyoside constituant un véritable groupement prothétique peut avoir une structure différente. HEWITT a montré en effet que le rapport de la somme galactose + mannose à la glucosamine est très variable selon la protéine considérée. RIMINGTON a admis l'existence d'un glucosaminodimannose. Donc, en toute objectivité, il nous semble préférable de conclure à une pluralité possible en ce qui concerne les glucides combinés aux protéines du plasma. Nos résultats nous rattachent à cette façon de voir et ne font que la confirmer.

Il est certain que les glucides combinés du sang participent au métabolisme des glucides ainsi que la montré H. BIERRY.

Ils jouent également un rôle au cours de la glycolyse. (BIERRY, RATHERY et KOURILSKY [12]). Les recherches qui vont suivre ont pour but d'apporter quelques précisions sur le rôle des glucides combinés du sang au cours du phénomène de la glycolyse.

III. Participation des glucides combinés du sang au phénomène de la glycolyse.

Nous venons d'établir que l'hydrolyse des glucides combinés du plasma libre, d'une part, des oses entièrement fermentescibles et faiblement combinés et, d'autre part, des glucides ne fermentant pas au contact de la levure de bière dans les conditions où nous nous sommes placés et libérables que sous l'action de l'acide sulfurique normal, tandis que les premiers apparaissent par hydrolyse en présence d'acide acétique 0,2 normal [26]. BIERRY, RATHERY et KOURILSKY [13] ont montré que le sucre protéidique total est susceptible de variations au cours de la glycolyse. Nous nous sommes demandés dans quelle mesure les deux fractions envisagées ci-dessus participent respectivement au phénomène de la glycolyse dans le sang.

Nous avons utilisé dans ce but la technique de J. ROCHE et A. ROCHE [68]. Pour cela nous avons laissé la glycolyse évoluer à 37° C dans du sang total d'Homme ou de Lapin, prélevé aseptiquement. Nous avons dosé, d'heure en heure, dans le plasma séparé par centrifugation le glucose libre par la méthode de référence antérieurement choisie (voir p. 22) et, simultanément, d'une part, les glucides fermentescibles libérables par acétolyse (b), et, d'autre part, le sucre protéidique total (a) à l'aide des techniques que nous avons antérieurement mises au point (voir p. 52 et 59).

Les résultats de six expériences de ce type sont rassemblées dans le tableau XV [27] ci-dessous. Les résultats de l'expérience N° 6 ont permis d'établir la figure D, laquelle traduit avec une grande netteté le phénomène que nous avons observé.

TABLEAU XV.

Variations des glucides combinés du sang au cours de la glycolyse
(résultats exprimés en gr. de glucose p. 1.000 cm³ de plasma).

Sang humain.

	Durée de la glycolyse				
	0 h.	2 h.	4 h.	6 h.	8 h.
N° I.					
Glycémie libre	1,07	0,55	0,22	0,03	0,00
Glucides libérés par acétolyse (b)	0,32	0,13	0,05	0,00	—
Glucides protéidiques totaux (a)	2,37	2,49	2,52	2,58	—
Glucides libérés par SO ₄ H ₂ (a-b)	2,05	2,36	2,47	2,58	—
N° II.					
Glycémie libre	0,98	0,40	0,26	0,06	0,00
Glucides libérés par acétolyse (b)	0,34	0,20	0,06	0,02	—
Glucides protéidiques totaux (a)	2,66	2,86	2,60	2,73	—
Glucides libérés par SO ₄ H ₂ (a-b)	2,32	2,66	2,54	2,71	—
N° III.					
Glycémie libre	0,95	0,49	0,34	0,04	0,01
Glucides libérés par acétolyse (b)	0,37	0,19	0,06	0,00	—
Glucides protéidiques totaux (a)	2,85	2,85	2,60	2,64	—
Glucides libérés par SO ₄ H ₂ (a-b)	2,48	2,66	2,54	2,64	—
N° IV.					
Glycémie libre	0,80	0,36	0,12	0,01	0,00
Glucides libérés par acétolyse (b)	0,20	0,11	0,01	0,00	—
Glucides protéidiques totaux (a)	2,20	2,32	2,24	1,18	—
Glucides libérés par SO ₄ H ₂ (a-b)	2,00	2,21	2,23	2,18	—
N° V.					
Glycémie libre	0,90	0,39	0,22	0,04	0,01
Glucides libérés par acétolyse (b)	0,38	0,16	0,04	0,00	—
Glucides protéidiques totaux (a)	2,70	2,82	2,78	2,75	—
Glucides libérés par SO ₄ H ₂ (a-b)	2,32	2,62	2,74	2,75	—
N° VI (sang de Lapin (voir figure)).					
Glycémie libre	1,34	0,92	0,23	0,02	0,00
Glucides libérés par acétolyse (b)	0,30	0,15	0,06	0,02	—
Glucides protéidiques totaux (a)	2,92	3,24	3,18	3,00	—
Glucides libérés par SO ₄ H ₂ (a-b)	2,62	3,09	3,12	2,98	—

Il ressort de l'examen de ces résultats que la glycolyse du sucre libre, complète au bout de 6 à 8 heures, est simultanée à la disparition de la fraction glucidique libérable par acétolyse et constituée par des oses fermentescibles. Pendant le même temps le taux des glucides libérables sous l'action de l'acide sulfurique, soit (a-b) a une tendance nette à s'élever, sans doute passagèrement. Ces résultats sont traduits graphiquement par la figure D.

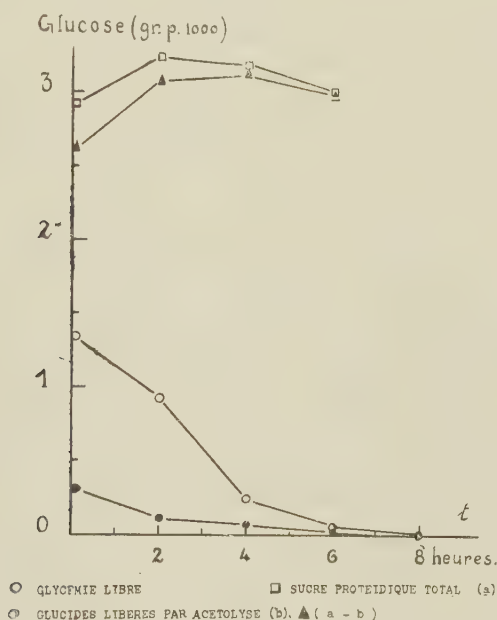


FIGURE D. — Variations des valeurs des glucides combinés au cours de la glycolyse du sang de Lapin.

Ces expériences démontrent la participation à la glycolyse de la fraction des glucides combinés du sang que nous avons caractérisée par sa liaison très labile aux protéines — ou à un autre constituant sanguin — et par la fermentescibilité des oses qui la constituent. Cette fraction glucidique disparaît complètement au cours de la glycolyse. Par ailleurs, l'augmentation du taux des glucides libérables sous l'action de l'acide sulfurique (abstraction faite des glucides libérés par acétolyse) peut traduire la formation de glycogène à partir des glucides sanguins qui participent à la glycolyse et envisagée par WILLSTÄTTER et RHOEWALD [78]. Des recherches entreprises

dans ce sens permettraient, peut être, de préciser la valeur de cette hypothèse ainsi que le rôle de la phosphorylation dans la glycolyse.

Ces résultats méritent d'être rapprochés de ceux de H. BIERRY qui a montré la participation du sucre protéidique au métabolisme glucidique à l'état normal et pathologique.

On voit donc qu'un certain nombre de recherches concourent pour démontrer que les glucides faiblement combinés doivent jouer un rôle important dans le métabolisme des glucides. Telle est l'opinion de LÉPINE au sujet du « sucre virtuel ». Les conceptions de H. BIERRY se rattachent à ce point de vue. Nos recherches sur la participation de ces glucides à la glycolyse viennent le confirmer. En outre, nous devons signaler que la fraction glucidique faiblement combinée a pu être retrouvée avec tous ses caractères dans l'hémolymphes d'un crustacé *Cancer Pagurus* par J. ROCHE et C. DUMAZERT [69] ; ces derniers ont montré que cette fraction glucidique constitue une réserve immédiatement utilisable au cours de l'hyperglycémie provoquée chez cet animal lorsqu'on le maintient un certain temps hors de l'eau (hyperglycémie asphyxique). Aussi avons nous jugé utile de souligner l'importance biochimique de la fraction glucidique faiblement combinée, importance que des recherches ultérieures préciseront davantage.

DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS.

Nous venons d'exposer les résultats de nos recherches et nous devons maintenant donner une vue d'ensemble de la contribution que nous avons apportée à la connaissance des glucides sanguins. Plusieurs questions ont été abordées au cours de ce travail.

1. — Fermentation de certains oses en solutions très diluées.

Nous avons tout d'abord été amenés à étudier la fermentation de solutions très diluées de divers oses. Une telle étude devait nécessairement précéder nos recherches sur la nature des glucides sanguins, en ce qui concerne leur caractère de fermentescibilité au contact de la levure de bière. En effet les solutions très diluées de glucides se comportent d'une façon très spéciale lorsqu'on les soumet à la fermentation. Des travaux antérieurs avaient déjà signalé que des glucides fermentescibles tels que le glucose, le mannose, le fructose sont immédiatement et quantitativement adsorbés par une suspension de levure lorsque celle-ci est ajoutée à des solutions très diluées de ces oses [65] et divers auteurs américains ont pensé, que dans de pareilles conditions, ils ne subiraient pas la fermentation. Cependant il a été démontré que du gaz carbonique pouvait prendre naissance ; la quantité de gaz ainsi produite s'est montrée très inférieure à celle que l'on peut calculer d'après l'équation de GAY-LUSSAC. Dès lors, on peut mettre en doute que ce gaz carbonique tire uniquement son origine du glucide soumis à la fermentation surtout si l'on opère dans un milieu complexe tel que le sang, ainsi que l'a fait HOLDEN [45 bis]. En effet, le gaz carbonique peut provenir d'autres substances que la levure est susceptible de dégrader (par exemple décarboxylation d'acides aminés, de l'acide pyruvique sous l'action de la carboxylase). Ainsi apparaît le

manque de spécificité de la caractérisation et du dosage du gaz carbonique résultant de l'action de la levure de bière sur un milieu plus ou moins complexe contenant des glucides fermentescibles en très faibles quantités.

Par contre le dosage de l'alcool éthylique résultant de la fermentation permet de caractériser spécifiquement la fermentescibilité des glucides, l'alcool ne pouvant tirer son origine que de ceux-ci. Certains auteurs ont pu démontrer que de l'alcool prend naissance au sein de solutions très diluées de glucides fermentescibles additionnées de levure de bière (GUILLEMET [36], NICLOUX et GRABAR [60] ; mais ici encore, la quantité d'alcool résultant de la fermentation est loin d'avoir la valeur que l'on peut calculer d'après l'équation de GAY-LUSSAC. Cependant ceci démontre nettement qu'en dépit de leur adsorption par la levure des oses tels que le glucose, le mannose, le fructose subissent réellement la fermentation alcoolique. On ne sait si cette réaction se fait à l'intérieur ou à la surface du corps de la levure ; on sait seulement que les glucides sont capables de pénétrer dans la cellule ; on peut supposer que les molécules glucidiques sont en partie utilisées comme métabolite. Comme tels, la levure pourra les utiliser comme source d'énergie, les dégrader, d'où l'origine de l'alcool et du gaz carbonique mis en évidence par divers auteurs. Mais elle pourra également se servir de ces glucides pour constituer des réserves ; d'ailleurs, WILLSTÄTTER et RHODEWALD [78] ont pu mettre en évidence la formation de glycogène par les levures à partir du glucose que l'on soumet à leur action. Ainsi donc une partie des glucides se trouve dégradée en alcool et en gaz carbonique alors qu'une autre partie échappe à ce processus et se trouve emmagasinée sous forme de glycogène. On peut expliquer ainsi que le rendement en alcool et en gaz carbonique de la fermentation de solutions très diluées de glucides soit inférieur à celui prévu par l'équation de GAY-LUSSAC. Il est normal que ce rendement soit d'autant plus bas que la concentration en glucides est plus faible, car de pareilles conditions de vie dictent alors à la levure d'enrichir ses réserves et de ralentir sa reproduction pour augmenter la durée de son existence. Ce cas est tout à fait différent de celui où la levure se trouve en présence de quantités élevées de glucides utilisables. Les phénomènes de reproduction l'emportent alors largement, et quoi de plus normal que, dans de

telles conditions, le rendement en alcool et gaz carbonique tende de plus en plus à s'approcher de la valeur théorique, sans parvenir toutefois à l'atteindre d'une façon absolue ? On doit donc s'attendre à ce que la fermentation des solutions très diluées de glucides évolue d'une façon toute différente de celle des solutions concentrées, mais les recherches antérieures démontrent que la fermentation a réellement lieu ; seuls les rendements en alcool et en gaz carbonique sont considérablement abaissés. Une question se pose alors : dans des conditions bien déterminées la fermentation des glucides en solutions très diluées obéit-elle cependant à des lois précises ? Nos recherches sur l'évolution de la fermentation du glucose en solutions de faibles concentrations nous permettent de répondre par l'affirmative à cette question. En effet nous avons montré que si l'on fixe soigneusement les conditions de pH, de température, de durée de la fermentation, de quantité et de qualité de la levure, on obtient la production d'une quantité d'alcool caractéristique de la concentration de la solution de glucose mise en œuvre. Enfin nous avons montré que la relation qui unit le rendement maximum en alcool (obtenu au bout de 2 h. 30 minutes de contact à 37° C entre une quantité de levure et un volume déterminés de solution de glucose de pH = 5,6) et la concentration de la solution de glucose peut être traduite graphiquement par une courbe continue, assimilable à une droite pour des concentrations comprises entre 0,50 g. et 1,80 g. de glucose. Nous en concluons que la fermentation du glucose en solutions très diluées obéit à des lois précises. Ceci nous a permis de proposer une méthode de dosage du glucose en solutions de concentrations comprises entre 0,50 g. et 1,80 g. p. 1.000 cm³, basée sur la détermination de la quantité d'alcool formée sous l'action de la levure de bière. Les résultats ainsi obtenus sont précis à 5 p. 100 près (dans les cas les plus défavorables) mais valables seulement pour une quantité et une qualité de levure et pour un glucide donnés, ici le glucose ; un étalonnage préalable est nécessaire pour chaque glucide que l'on se propose de doser et pour chaque espèce de levure.

Une fois cette étude terminée en ce qui concerne le glucose nous avons poursuivi nos recherches sur la fermentation des oses auxquels l'hydrolyse du plasma sanguin donne naissance.

Nous avons montré que le galactose et la glucosamine ne fermentent pas dans de telles conditions ; que le mannose subit la fermentation alcoolique, mais que le rendement en alcool produit est très légèrement inférieur à celui que fournirait une solution de glucose de même concentration.

Enfin nous avons entrepris d'autres recherches pour savoir comment évoluait la fermentation dans les mélanges de différents glucides. Les mélanges étudiés ont été ceux contenant les divers glucides dont nous pouvions prévoir la présence simultanée dans les hydrolysats du plasma sanguin, d'après les recherches antérieures sur la nature des oses constituant le sucre protéidique, à savoir : galactose, mannose, glucosamine qu'accompagne toujours le glucose dans les hydrolysats considérés. Cette étude était indispensable car on sait que certains glucides non fermentescibles, tels que le galactosé, les pentoses, peuvent être entraînés à fermenter lorsqu'on les met en présence de glucides fermentescibles tels que le glucose. Rien de tel ne s'est produit pour les mélanges galactose + glucose, glucose + galactose + glucosamine dans lesquels le glucose fermente comme s'il était seul, ainsi que nous l'avons montré. Par contre nous avons montré l'allure particulière que revêt la fermentation du mélange glucose + mannose, fait dont il sera tenu compte en ce qui concerne l'interprétation des résultats fournis par la fermentation du mélange glucidique complexe résultant de l'hydrolyse sulfurique des glucides protéidiques totaux du plasma sanguin.

En résumé, ces recherches nous ont permis de montrer que la fermentation des solutions des glucides considérés soit seuls, soit sous forme de mélange, évolue en obéissant à des lois précises ; si l'on se place dans des conditions toujours identiques, il est possible d'obtenir des résultats comparables quantitativement. Il résulte donc que cette étude présente non seulement un intérêt en elle-même, mais encore elle nous permet de proposer une technique de dosage des glucides fermentescibles à partir de l'alcool produit au contact de la levure de bière.

II. — Sucre libre du sang.

C'est un fait bien établi que la glucidémie libre du sang est constituée par du glucose. Mais on sait qu'un certain doute

subsiste sur le fait que cet aldose soit l'unique glucide présent dans le sang. Le dosage des glucides par la technique que nous avons mise au point et qui consiste à évaluer la quantité de glucide fermentescible à partir de l'alcool prenant naissance sous l'action de la levure de bière, nous a permis de montrer que le sucre libre du sang est constitué uniquement par du glucose. En effet, la quantité d'alcool formée dans ces conditions correspond quantitativement à la quantité de glucide exprimée en glucose et dosée, par ailleurs, au moyen de la méthode de HAGEDORN et JENSEN après déprotéinisation cadmique. C. DUMAZERT a déjà montré que cette méthode permet le dosage direct de la glycémie vraie, ou sucre fermentescible du sang, car ses résultats ne sont pas entachés d'erreurs dues au reste de fermentation.

La glucidémie vraie doit donc être considérée comme constituée par du glucose, ou tout au moins, par un ensemble de glucides fermentescibles par la levure de bière identiquement à celui-ci. Or, ces glucides sont au nombre de trois : le glucose, le mannose et le fructose. La présence de fructose libre dans le sang doit être éliminée puisque C. DUMAZERT et Mlle M. BIERRY [19 et 19 bis] ont eu l'occasion de vérifier qu'il n'existait pas de céto-hexose. En effet ces auteurs ont montré que le sucre sanguin est bien aldosique puisque des dosages effectués sur un même sang par la méthode de HAGEDORN et JENSEN, laquelle dose en bloc les aldoses et les céto-ses, et par la technique iodométrique spécifique des aldoses, conduisent à des valeurs identiques. Par ailleurs toutes les tentatives de caractérisation du mannose libre dans le sang normal n'ont pas donné de résultats positifs (1).

En résumé nous pensons que la totalité des substances glucidiques réductrices du sang est entièrement fermentescible et constituée uniquement par du glucose, sans préjuger de la forme isomérique sous laquelle ce dernier est présent dans le sang circulant dans les vaisseaux.

III. — Glucides combinés du plasma.

Nos recherches nous ont amenés à considérer l'existence de deux fractions glucidiques distinctes parmi les glucides combinés du plasma des mammifères : la première libérable

(1) On pourrait en dire autant du maltose, diholoside également fermentescible par la levure de bière.

par les acides faibles (acétique) ou par les acides forts très dilués, la seconde ne pouvant être mise en évidence que par un processus d'hydrolyse mettant en œuvre un acide fort en solution normale (acide sulfurique). Cette distinction de deux fractions glucidiques s'appuie essentiellement sur le fait suivant : la première fraction libérable par acétolyse présente une valeur assez faible, comprise entre 0,20 et 0,50 g. p. 1.000 environ (exprimée en glucose) et pratiquement constante pour une espèce animale donnée, alors que la deuxième fraction existe à un taux plus élevé, de l'ordre de 1,50 à 3 g. p. 1.000, est très variable selon les individus d'une même espèce. Les variations notables de cette dernière sont absolument indépendantes de celles, très faibles, que peut présenter le taux des glucides libérables par acétolyse. On ne saurait donc admettre que la première fraction est constituée par certains glucides plus faciles à détacher d'un polyside qui constituerait à lui seul le sucre protéidique total. Dans ce cas en effet on devrait observer des variations parallèles entre les glucides libérables par acétolyse et ceux prenant naissance au cours de l'hydrolyse du plasma par les acides forts. Tel n'est pas le cas de ce que nous avons observé ; aussi nous concluons à l'existence d'au moins deux fractions parmi les glucides combinés du plasma sanguin.

Pour chacune d'entre elles nous proposons une technique de microdosage sur la justification desquelles nous ne reviendrons pas ici (voir p. 52 et p. 59). Nous préférons discuter un peu plus longuement les résultats de nos recherches en ce qui concerne la nature des constituants de ces deux fractions.

A. — *Fraction glucidique faiblement combinée.*

Nous avons montré l'existence d'une fraction glucidique libérée de sa combinaison par les acides faibles ou par les acides forts en solution très diluées. Ce fait nous permet de conclure à la très grande fragilité de la liaison qui unit ces glucides à un constituant du plasma dont nous n'avons pas cherché à préciser la nature ; nous ne pouvons donc pas affirmer qu'il s'agit d'une copule protéidique. Nous n'avons pas cherché à caractériser la nature exacte du (ou des glucides) libéré au cours de l'hydrolyse du plasma par les acides

faibles. Par contre, nous avons montré le caractère de fermentescibilité de cette fraction glucidique. En effet, après acétolyse, le plasma soumis à la fermentation donne naissance à une quantité d'alcool supérieure à celle que l'on obtient quand on fait fermenter ce même plasma sans hydrolyse préalable. Grâce à la technique de dosage des glucides fermentescibles à partir de l'alcool formé sous l'action de la levure de bière, que nous avons mise au point, il nous a été possible de calculer que l'excès d'alcool ainsi obtenue correspond à une quantité de glucide, exprimé en glucose, équivalente à celle des glucides libérés par acétolyse et dosée par ailleurs par la méthode de réduction. Nous en concluons que la fraction glucidique libérée dans ces conditions est entièrement constituée par des glucides fermentescibles à l'égal du glucose, dans les conditions où nous nous sommes placés. On serait même tenté de conclure que l'on est uniquement en présence de glucose. Il faut cependant se garder d'une affirmation trop hâtive car d'autres glucides peuvent présenter un caractère de fermentation *quasi* identique à celui du glucose. Nous avons vu en effet qu'en solution pure le mannose donne naissance à des quantités d'alcool sensiblement équivalentes à celles données par le glucose. On peut penser, d'après les travaux de certains auteurs, qu'il en serait de même pour le fructose. En outre rien n'exclut la possibilité que la fraction glucidique libérée par acétolyse ne soit un polyside fermentescible au contact de la levure de bière, tel que le saccharose ou le maltose par exemple. Signalons à cette occasion que les recherches de C. DUMAZERT et MEMMI (1), postérieures aux nôtres, semblent montrer que le constituant du glucide libérable par acétolyse soit identifiable au maltose ce qui est d'ailleurs en accord avec certains travaux de LÉPINE. En effet ces auteurs ont observé la formation de maltosazone à partir des hydrolysats acétiques du plasma traités, après concentration, par la phenyl-hydrazine. Enfin nos recherches ont montré que les glucides libérables par les acides faibles participent à la glycolyse sanguine. Au cours de ce phénomène nous avons constaté leur disparition complète simultanément à celle du glucose sanguin.

Ces caractères de labilité, de fermentescibilité ainsi que leur participation à la glycolyse permettent de penser que les

(1) Inédit.

glucides libérables par acétolyse sont utilisables très facilement au cours du métabolisme des glucides. En cela, cette fraction glucidique répond parfaitement au rôle du « sucre virtuel » ainsi que le définit LÉPINE (voir p. 44) ; il s'agirait d'une réserve glucidique immédiatement utilisable. C'est bien ce qui se passe chez *Cancer Pagurus*. L'hémolymphe de ce crustacé contient en effet, ainsi que l'ont montré J. ROCHE et C. DUMAZERT [69], une fraction glucidique faiblement combinée et fermentescible qui est utilisée dès que se déclenche l'hyperglycémie asphyxique provoquée en maintenant cet animal hors de l'eau. On peut donc penser que c'est à cette fraction glucidique que revient, en partie tout au moins, le rôle physiologique assigné par H. BIERRY au sucre protéidique. Tous ces faits permettent de souligner l'importance particulière que présentent les glucides faiblement combinés, que nous croyons identifiables au « sucre virtuel » de LÉPINE.

B. — *Fraction glucidique fortement combinée.*

La deuxième fraction du sucre protéidique est définie, selon nous, par les caractères suivants : nous avons montré que cette fraction glucidique est libérée seulement sous l'action des acides forts. Ce fait nous permet de conclure à une grande solidité de la liaison qui unit ces glucides aux protéines du plasma. Avant nous, d'autres auteurs ont montré que les oses prenant naissance dans de telles conditions d'hydrolyse du plasma sont représentés par du galactose, du mannose et de la glucosamine. H. BIERRY a isolé un polysaccharide constitué par une molécule de chacun de ces oses, soit un galacto-glucosamino-mannose. RIMINGTON déclare n'être jamais parvenu à déceler le galactose et admet l'existence d'un trioside qui serait un glucosamino-dimannose. Cependant SÖRENSEN et HAUGAARD [72 bis] caractérisent le galactose au cours de leurs travaux, confirmant donc ceux de H. BIERRY. HEWITT accepte la présence d'un glucosamino-galacto-mannose, bien qu'il n'ait pas cherché à isoler ce polyoside. Ainsi d'après ces résultats, on est conduit à admettre la présence d'un polyoside unique, toujours le même quelle que soit la protéine envisagée. Les travaux de M. SÖRENSEN [72] remettent cependant cette conclusion en doute, car cet auteur montre que selon la protéine plasmatique considérée les dosa-

ges de la glucosamine ne sont pas en accord avec l'existence du galacto-glucosamino-mannose uniquement. SÖRENSEN trouve en effet une quantité de glucosamine toujours supérieure à celle qu'impliquerait une telle conception.

Nos travaux ne nous permettent pas de trancher d'une manière définitive la question de savoir s'il existe un ou plusieurs polyosides représentant un groupement prosthétique des protéines plasmatiques. Ils ne nous permettent que de formuler certaines suggestions à ce sujet. Nous avons montré que la glucosamine est strictement localisée dans la fraction glucidique libérable par l'action de l'acide sulfurique N. Les variations de cet aminoglucide suivent avec un parallélisme très net celles du taux du sucre protéidique fortement combiné. En accord avec les travaux de M. SÖRENSEN il nous a paru que le taux de glucosamine était supérieur à celui correspondant à l'existence du seul galacto-glucosamino-mannose dans le plasma sanguin. En outre la sensible augmentation des glucides fortement combinés, au cours de la glycolyse montre que cette fraction glucidique est susceptible de remaniements importants, dont le résultat est l'altération de sa structure en tant que polyoside unique et bien déterminée. Ceci nous permet de conclure qu'à côté du trisaccharide, isolé par H. BIERRY et dont l'existence ne saurait faire aucun doute, il existe, vraisemblablement d'autres fractions glucidiques ne pouvant être mises en évidence, elles aussi, que par un processus d'hydrolyse énergétique.

Une telle hypothèse nous paraît être confirmée par d'autres résultats ayant trait aux réactions humérales au cours de certaines infections. L'exemple des pneumonies et particulièrement suggestif. On sait en effet qu'il a été possible d'isoler des différents pneumocoques des glucides spécifiques de chacun d'entre eux (1). Le glucide (G_3) extrait du pneumocoque III a été copulé avec une protéine quelconque. Ce complexe injecté à un animal s'est montré doué d'énergiques propriétés spécifiquement immunisantes vis-à-vis du pneumocoque III. Une telle expérience contribue grandement à montrer que les processus immunologiques de l'infection considérée s'accompagnent de l'apparition dans le sang de complexe protéido-glucidique. Ceci plaide donc en faveur de l'existence possible d'osi-

(1) Voir à ce sujet la conférence très documentée de VELLUZ [79].

des de nature différente en combinaison avec les protéines plasmatiques.

Telles sont les considérations qui nous conduisent à admettre la pluralité des osides faisant partie intégrante des protéines du plasma.

C. — *Nature des liaisons glucido-protéidiques.*

Il nous reste à dire quelques mots sur la nature des liaisons glucido-protéidiques des glucides combinés du plasma. Nous avons vu qu'une première fraction est très faiblement combinée ; une seconde fraction au contraire est caractérisée par une solide liaison qui l'unit aux protéines. La combinaison des glucides aux protéines a fait l'objet des importants travaux de PRZYLECKY [64 bis]. Cet auteur conclue à la possibilité d'une combinaison entre protides et glucides soit simple, oses, osides cristallisés, soit plus compliqués tels que les polyosides colloïdaux (amylose). Cet auteur a donné le nom de « mono et poly-components » à ces combinaisons glucido-protéidiques. Ces combinaisons ne sont pas de simples adsorptions et PRZYLECKY les ramène aux types de réaction suivants : 1° par valence principale ; 2° par valence secondaire (simplexes de WILLSTÄTTER) ; 3° par les forces électrostatiques (type des sels) ; 4° par les forces de cohésion surtout des groupes apolaires. Les complexes gluco-protéidiques préparés par PRZYLECKY ne sont pas très stables ; ils sont décomposés à froid dès que l'on passe en milieu suffisamment acide. La fraction glucidique faiblement combinée, dont nous avons montré l'existence dans le plasma, s'apparente donc, par cela, très étroitement aux gluco-protéides de cet auteur. La nature de la liaison peut donc être rattachée, dans ce cas, au type des simplexes de WILLSTÄTTER. Par contre, un type de liaison tout différent caractérise la deuxième fraction glucidique, celle-ci fortement combinée, ainsi que nous l'avons montré. Cette deuxième fraction nous paraît combinée aux protéines grâce à un type de liaison mettant en œuvre les valences principales ainsi que le pense H. BERRY.

RÉSUMÉ DES CONCLUSIONS.

Nous pouvons résumer les résultats de nos recherches de la façon suivante :

1° Nous avons montré que la fermentation des glucides en solutions très diluées obéit à des lois précises si l'on se place dans des conditions bien déterminées. Le glucose, le mannose, le galactose et la glucosamine ont fait l'objet d'une étude systématique en ce qui concerne le rendement en alcool de leur fermentation au contact de la levure de bière. Considérés isolément, le glucose et le mannose donnent naissance à des quantités d'alcool pratiquement équivalentes (un peu inférieure pour le mannose) dans les conditions où nous nous sommes placés. L'étude de la fermentation des mélanges constitués par les oses ci-dessus nous a montré que le galactose et la glucosamine ne fermentent pratiquement pas. La fermentation du mélange glucose + mannose revêt un caractère très particulier. La présence du mannose abaisse le rendement en alcool observé au bout de 2 h. 30 m., temps au bout duquel la fermentation n'est d'ailleurs pas terminée.

2° Cette étude de la fermentation des glucides en solution très diluées nous a permis la mise au point d'une méthode de dosage du glucose à partir de la quantité d'alcool formée sous l'action de la levure de bière. Ce dosage est correct lorsque le milieu contient outre le glucose, du galactose et de la glucosamine. La présence de mannose est une cause d'erreur par défaut.

3° Nous avons appliqué la technique ci-dessus au dosage de la glucidémie libre, ce qui nous a permis de conclure que le glucose est le seul glucide existant à l'état libre dans le plasma sanguin des mammifères si l'on tient compte de l'ensemble des résultats antérieurs acquis à ce sujet.

4° Nous avons montré l'existence d'une fraction glucidique faiblement combinée dans le plasma sanguin et caractérisé celle-ci par sa fermentescibilité et sa participation à la glycolyse. Elle nous paraît devoir être assimilée au « sucre virtuel » de LÉPINE et jouer un rôle important dans le métabolisme des glucides. Nous avons décrit une technique de microdosage de cette fraction glucidique.

5° Une autre fraction glucidique existe dans le plasma à l'état de combinaison. Elle est caractérisée par une liaison très solide aux protéines sanguines. Sa nature nous paraît plus complexe que celle répondant à un polyholoside unique (galacto-glucosamino-mannose). Cette fraction contient la glucosamine. Elle paraît subir une légère augmentation au cours de la glycolyse. Nous proposons enfin de la doser par une micro-méthode présentant un caractère de fidélité satisfaisant.

Marseille, le 27 août 1940.

Vu : *Le Président*,
JEAN ROCHE.

Vu et approuvé :
Le Doyen,
LUCIEN CORNIL.

Vu et permis d'imprimer :
Aix, le 22 septembre 1940,
Le Recteur,
E. GAU.

BIBLIOGRAPHIE.

1. ABDERHALDEN, BERGELL et DÖRPINGHAUS. — *Zeits. für phys. chem.*, 1904, **41**, 530.
2. ARMSTRONG. — The mechanism of fermentation. *Pro. Roy. Soc.*, 1905, **76**, 600.
3. BAUDOIN (A.). — Etude sur quelques glycémies. La glycémie expérimentale. *Thèse de Doctorat en Médecine*. Faculté de Paris, 1908.
4. BAUDOIN (A.). — Le dosage des matières réductrices du sang. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, **10**, 979-1040.
5. BERNARD (C.). — *Archives générales de Médecine* 1838, **18**, 303.
6. BIERRY (H.) et FANDARD (L.). — Sur le sucre du sang. *C. R. Soc. Biol.*, 1912, **72**, 928.
7. BIERRY (H.) et FANDARD (L.). — *C. R. Ac. des Sc.*, 1913, **156**, 480 et 2010. Cité d'après [12].
8. BIERRY (H.) et FANDARD (L.). — Sucre protéidique et sucre virtuel. *C. R. Ac. Sciences*, 1914, **158**, 516.
9. BIERRY (H.) et GOIRAN (Mlle). — Microdosage du glucose ; application au dosage du glycogène. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 253.
10. BIERRY (H.) et MAGNAN. — Microdosage du sucre protéidique. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 257.
11. BIERRY (H.) et RANG (A.). — Sucre protéidique du plasma sanguin. *C. R. Ac. Sciences*, 1914, **158**, 278.
12. BIERRY (H.) et RATHERY (F.). — Introduction à la physiologie des sucres. 1935, 1 vol., Baillièrre et fils éditeurs. Paris.
13. BIERRY (H.), RATHERY (F.) et KOÛRILSKY. — Glycolyse aseptique. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **90**, 417 ; *Ibid.*, 1925, **92**, 480.
14. BIERRY (H.) et VOSKRESSENKY. — Microdosage du sucre protéidique du plasma sanguin. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 287 et 744.
15. BIGWOOD (E. J.) et VUILLOT (Mlle A.). — Des substances réductrices et fermentescibles combinées aux albumines du sérum sanguin. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 187.
16. BIGWOOD (E. J.) et VUILLOT (Mlle A.). — Du sucre sanguin dénommé protéidique. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 417.
17. BIGWOOD (E. J.) et VUILLOT (Mlle A.). — Du sucre sanguin dénommé protéidique dans le plasma sanguin. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **10**, N° 2, 186.
18. DISCHE (Z.). — *Bioc. Zeits.*, 1926, **175**, 371.
19. DUMAZERT (C.). — Recherches sur le dosage de la glycémie. I. Déprotéinisation par l'hydrate de cadmium et glycémie. II. Microdosage iodométrique de la glycémie. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1935, **17**, 1163-1177.

- 19 bis. DUMAZERT (C.) et BIERRY (Mlle M.). — Déprotéinisation mercuro-cadmique et microdosage iodométrique de la glycémie. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 737.
20. DUMAZERT (C.). — Sur le microdosage iodométrique des aldoses et son application au dosage de la glycémie. *Thèse de Doctorat en Pharmacie*. Faculté de Marseille 1936.
21. DUMAZERT (C.) et PENET (G.). — Sur l'évolution et le rendement en alcool de la fermentation du glucose en solution très diluée par les levures. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 75.
22. DUMAZERT (C.) et PENET (G.). — Sur la formation de l'alcool au cours de la fermentation du sucre sanguin et sur la nature des glucides plasmatiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 78.
23. DUMAZERT (C.) et PENET (G.). — Sur la nature du sucre libre du sang. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, **20**, 1211-1222.
24. DUMAZERT (C.) et PENET (G.). — Sur la fermentation des glucides en solutions très diluées. *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 148.
25. DUMAZERT (C.) et PENET (G.). — Contribution à l'étude du sucre sanguin. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 913.
26. DUMAZERT (C.) et PENET (G.). — Sur la nature des glucides combinés du sang. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 558.
27. DUMAZERT (C.) et PENET (G.). — Glucides combinés du sang et glycolyse. *C. R. Soc. Biol.*, 1939,
28. EGE (R.) et ROCHE (J.). — Sur le taux des substances réductrices non fermentescibles et non glycolysables dans le sang humain. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **101**, 93.
29. EICHHOLZ. — *Journal of physiol.*, 1901, **23**, 163.
30. FIGUIER. — *Gazette hebdomadaire de Médecine et de Chirurgie*, 1855, 763.
31. FISCHER (E.). — *Ber. d. d. Chem. Ges.*, 1888, **21**, 884.
32. FONTÈS (G.) et THIVOLLE (L.). — Recherches expérimentales sur le microdosage des substances réductrices du sang. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, N° 4, 353-445.
33. FRÄNKEL (S.). — *Monatshefte f. Chem.*, **19**, 819.
34. FRÄNKEL (S.) et JELLINEK. — *Biochem. Zeits.*, 1927, **185**,
35. FUJITA (A.) et IWATAKE (D.). — Bestimmung des echten blutgucker ohne Hefe. *Biochem. Ztsch.*, 1931, **243**, 43.
36. GUILLEMET (R.). — Contribution à l'étude de la fermentation alcoolique. La fermentation panaière. *Thèse de Doctorat ès Sciences*. 1936. Faculté des Sciences de Strasbourg. M. Declume éditeur, Lons-le-Saunier.
37. HANRIOT. — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **50**, 543, cité d'après [12].
38. HÉDON. — *C. R. Soc. Biol.*, 1898, **50**, 510. Cité d'après [12].
39. HEWITT (J. A.). — Séparation of serum albumin into two fractions. *Biochem. Journ.*, 1936, **30**, 2,229-2,236.
40. HEWITT (J. A.). — Observation on the nature of glyco-protein fraction. *Bioch. J.*, 1937, **31**, 360-366.
41. HEWITT (J. A.). — On the presence of a new serum protein in the blood of various animal. *Bioch. Journ.*, 1937, **31**, 1534-1537.
42. HEWITT (J. A.). — Préparation and properties of a globulin present in the albumin fraction of serum. *Biochem. Journ.*, 1938, **32**, 26-30.

43. HEWITT (J. A.). — The polysaccharide content and reducing power of proteins and their digest products. *Bioch. J.*, 1938, **32**, 1554-1560.
44. HEWITT (J. A.). — Observations on the polysaccharide complex present in serum proteins and on the effect of pepsin on serum protein. *Bioch. Journ.*, 1939, **33**, 1496-1505.
45. HEWITT (J. A.) et PRYDE (J.). — The metabolism of carbohydrates. I. Stereo chemical changes undergone by equilibrated solutions of reducing sugars in the alimentary canal and peritoneal cavity. *Biochem. Journ.*, 1920, **14**, 395.
- 45 bis. HOLDEN (R. F.). — Determination of fermentable blood sugar by gazometric measurement of the carbon dioxide formed by the action of the yeast. *J. of Biol. Chem.*, 1937, **119**, 347.
46. HOPKINS. — The selective fermentation of glucose and fructose by brewer's yeast. *Biochem. Journ.*, 1928, **22**, 1145.
47. HOPKINS et ROBERTS. — The Kenitic of alcoholic fermentation of sugars by brewer's yeast. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 919.
48. LEHMANN. — *Gazette hebdomadaire de Médecine et de Chirurgie*, 1855, 763.
49. LANDWEHR. — *Zeit. Physiol. Chem.*, 1882, **6**, 74.
50. LÉPINE (R.). — Le sucre du sang. 1921. Librairie Alcan, Paris.
51. LÉPINE (R.). — *Revue Scientifique*, 27 mai 1911, 641.
52. LÉPINE (R.) et BOULUD. — A propos des sucres du sang. *C. R. Ac. Sciences*, **133**, 138.
53. LÉPINE (R.) et BOULUD. — Sur l'existence du maltose dans le sang. Sur le sucre faiblement combiné dans le sang. *C. R. Ac. Sciences*. 1913, **136**, 1.037 ; 1914, **138**, 610 ; 1916, **142**, 197.
54. LÉPINE (R.) et BOULUD. — *Lyon Médical*, 1913, **121**, 997.
55. LEVENE (P. A.) et MORI (I.). — The carbohydrate group of ovomucoid. *J. Biol. Chem.*, 1929, **84**, 49.
56. LEVENE et ROTHEN. — On the molecular size of the carbohydrates obtained from egg's proteing. *J. Biol. Chem.*, 1929, **84**, 63.
57. MIURA. — *Zeits f. Biol.*, 1895, **14**, 279.
58. MORNER. — *Centralblatt. f. Physiol.*, 1893, 581.
59. NICLOUX (M.). — Recherches sur l'alcool éthylique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, **13**, 857-918 ; *Ibid.*, 1934 (octobre), p. 1317.
60. NICLOUX (M.) et GRABARD (P.). — Possibilité de suivre la fermentation de petites quantités de glucose par le dosage de l'alcool produit. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 1280.
61. NILSSON (I.). — *Bioch. Zeits.*, 1936, **285**, 386.
62. PAVY. — *Physiology of the carbohydrates*. Londres 1894.
63. PAVY et SIAU. — *Journ. of Physiol.*, 1901, **26**, 287.
64. PICHARDT. — *Physiol. Chem.*, 1892, **17**, 217.
- 64 bis. PRZYLECKY. — VI^e Congrès de Chimie biologique 1937, 1 vol., Declume éditeur, Lons-le-Saunier.
65. RAYMOND et BLANCO (J. C.). — Blood sugar determination and separation of sugars with live yeast. *Journ. of Biol. Chem.*, **79**, 649.
- 65 bis. REMINGTON. — *Biochem. Journ.*, 1931, **25**, 1062.

66. RIMINGTON (C.). — The chemistry of the proteins and amino-acids. *An review. of Bioch.*, 1936, **5**, 117-158.
67. ROCHE (J.). — Recherche sur le phosphore acido-soluble du sang. Sur la participation de corps phosphorés au pouvoir réducteur du sang. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, 636-655.
68. ROCHE (J.) et ROCHE (A.). — Recherches sur la participation d'une combinaison phosphorée à la glycolyse du sang « in vitro ». *Soc. de Chimie Biologique* ; séance du 19 mars 1929.
69. ROCHE (J.) et DUMAZERT (C.). — Sur les glucides de l'hémolymphe de *Cancer Pagurus*. Nature et rôle physiologique. *An. Inst. Océano.* 1939, **20**, f. 3, 87-95.
70. RONA (P.) et FABISCH (W.). — Untersuchungen über den Blutzucker. I. *Bioch. Ztschr.*, 1929, **217**, 1-33 ; *Praktikum der Physiologischen chemie* von RONA. Berlin, 1926.
71. SOBOTKA et REINER. — Selective fermentation of glucose, fructose and mannose mixtures. *Bioch. Journ.*, 1930, **24**, 926.
72. SÖRENSEN (M.). — *C. R. Laboratoire de Carlsberg*. Série chimique, 1938, **22**, 487.
- 72 bis. SÖRENSEN et HAUGAARD. — *Biochem. Zeit.*, 1933, **260**, 247; *Ibidem.*, *C. R. Labor. Carlsberg.*, 1933, **19**, n° 12.
73. TAKAHASI. — *Bioch. Zeits.*, 1911, **37**, 30.
74. THOMAS (J.). — Contribution à l'étude du pouvoir rotatoire du sucre sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, **13**, 377-394.
75. THOMAS (J.). — De l'interférence de substances non glucidiques et notamment de l'acide lactique dans la mesure de l'activité optique du glucose sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 1280-1289.
76. VIALE. — *Archiv. ital. Biol.*, 1924.
77. WINTER (L. B.). — The nature of the blood sugar. *Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 851.
78. WILLSTÄTTER (R.) et RHODEWALD (M.). — *Ztsch. für physiol. chem.*, 1937, **247**, 269-280.
79. L. VELLUZ. — Chimie et immunité. VI^e Congrès de Chimie biologique, 1937, 1 vol., Declume Edit., à Lons-le-Saunier.

